

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Deni Karabatić**

**ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI  $\text{Cu(II)L}_n$   
KOMPLEKSA ANALIZOM INJEKTIRANJEM U PROTOK UZ  
SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun**

**Split, listopad 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Deni Karabatić**

**ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI  $\text{Cu(II)L}_n$   
KOMPLEKSA ANALIZOM INJEKTIRANJEM U PROTOK UZ  
SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun**

**Split, listopad 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Analitička kemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta te 14. sjednici Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Maja Biočić

### ODREĐIVANJE *N*-ACETIL-L-CISTEINA TEMELJENO NA REDUKCIJI $\text{Cu(II)}\text{L}_n$ KOMPLEKSA ANALIZOM INJEKTIRANJEM U PROTOK UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR. RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE

Deni Karabatić, broj indeksa 128

**Sažetak:** Razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cisteina protočnom analizom injektiranjem (FIA) uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks reakciji redukcije bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II) uz NAC u narančasto obojeni bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm. Optimalni kemijski parametri i parametri FIA sustava određeni su univarijantnom metodom na temelju čega je izrađena krivulja umjeravanja. Utvrđeno je da je linearno dinamičko područje (LDP) u rasponu koncentracija od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  uz jednadžbu pravca  $y = 8660x - 0,0028$  te koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) koji iznosi 0,9999. Određena je granica dokazivanja (LOD) od  $9,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  te granica određivanja (LOQ) od  $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Nakon optimizacije uslijedilo je i vrednovanje metode. Iskoristivost metode kretala se u rasponu od 94,64 % do 103,06 %, što upućuje na njenu točnost. Ispitivanjem utjecaja interferirajućih vrsta u koncentracijama značajno većim od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima, nije zamijećen poremećaj signala. Relativno standardno odstupanje iznosi 0,61 %, što upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode. S obzirom da je moguće ostvariti u prosjeku 40 analiza u triplikatu, učestalost je zadovoljavajuća. Utvrđeno je i da primjenom metode ne dolazi do prenošenja signala, a doseg (potpunost) reakcije iznosi 95 %. Predložena metoda korištena je za određivanje NAC-a u farmaceutskom pripravku te su rezultati uspoređeni sa standardnom metodom prema farmakopeji.

**Ključne riječi:** *N*-acetil-L-cistein, protočna analiza injektiranjem (FIA), spektrofotometrijski detektor

**Rad sadrži:** 79 stranica, 31 slika, 9 tablica, 42 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo, predsjednik
2. doc. dr. sc. Franko Burčul, član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun, član – mentor

**Datum obrane:** 24. listopada 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

School of Medicine and Faculty of Chemistry and Technology  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Analytical chemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** Lea Kukoč Modun, PhD, assistant professor  
**Technical assistance:** Maja Biočić, PhD

### DETERMINATION OF *N*-ACETYL-L-CYSTEINE BASED ON THE REDUCTION OF Cu(II)Ln COMPLEX USING FLOW INJECTION ANALYSIS WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD

Deni Karabatić, index number 128

**Summary:** A new method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine by flow injection analysis (FIA) with a spectrophotometric detector has been developed and validated. The method is based on the redox reaction of the reduction of bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) with NAC into orange-colored bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I). The absorption maximum is reached at a wavelength of 483 nm. Optimal chemical parameters and FIA system parameters were determined by the univariate method and as a result, the calibration curve was constructed. Linear dynamic range was achieved for the concentration range from  $3.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  to  $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  with the equation  $y = 8660x - 0.0028$  and the correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.9999. The limit of detection ( $\text{LOD} = 9.00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) and the limit of quantification ( $\text{LOQ} = 3.00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) were determined. Optimization was followed by the validation of the method. The recovery of the method is ranged from 94.64 % to 103.06 % which indicates its accuracy. By observing the effect of interferences at concentrations significantly than those found in pharmaceutical formulations, no signal interference has been noted. The relative standard deviation (RSD) is 0.61 % which indicates adequate repeatability of the method. The frequency is also satisfying because around 40 analyzes in triplicate are possible. It was also found that this method does not allow the carryover of a signal. The completeness of the reaction is 95 %. The proposed method was used to determine NAC in pharmaceutical formulations and the results were compared with the standard pharmacopeia method.

**Keywords:** *N*-acetyl-L-cysteine, flow injection analysis (FIA), spectrophotometric detector

**Thesis contains:** 79 pages, 31 figures, 9 tables, 42 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Olivera Politeo, PhD, associate professor, chair person
2. Franko Burčul, PhD, assistant professor, member
3. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant professor, member – supervisor

**Defence date:** October 24, 2019

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. <i>N</i> -acetil-L-cistein .....	2
1.1.1. Kemijska svojstva .....	2
1.1.2. Farmakokinetika .....	2
1.1.3. Farmakodinamika .....	3
1.1.4. Farmaceutski oblici .....	3
1.1.5. Kontraindikacije i mjere opreza .....	4
1.1.6. Trudnoća i dojenje .....	4
1.1.7. Interakcije .....	4
1.1.8. Nuspojave .....	4
1.1.9. Predoziranje .....	5
1.2. Kinetičke metode analize .....	6
1.2.1. Red reakcije .....	7
1.2.2. Zakoni brzine .....	8
1.3. Protočna analiza injektiranjem (FIA) .....	9
1.3.1. Izvedbe FIA sustava .....	10
1.3.2. Disperzija uzorka .....	12
1.3.3. Fiagram .....	14
1.3.4. Instrumentacija .....	15
1.3.4.1. Crpka .....	16
1.3.4.2. Injekcijski ventil .....	17
1.3.4.3. Prijenosni sustav .....	18
1.3.4.4. Detektor .....	20
1.3.5. Primjena FIA sustava .....	21
1.4. Spektroskopija .....	22
1.4.1. Apsorpcija zračenja .....	23
1.4.2. Beerov zakon .....	25
1.4.3. Instrumentacija .....	26
1.4.3.1. Izvor zračenja .....	26
1.4.3.2. Selektor valnih duljina .....	26
1.4.3.3. Prostor za mjerenje .....	27
1.4.3.4. Detektor i procesor signala .....	28
1.4.3.5. Izvedbe spektrofotometra .....	28

2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	30
3. MATERIJALI I METODE .....	33
3.1. Priprava otopina.....	34
3.1.1. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera .....	34
3.1.2. Otopina natrijeva hidroksida.....	34
3.1.3. Otopina reagensa .....	34
3.1.4. Otopina <i>N</i> -acetil-L-cisteina (standardna otopina).....	35
3.1.5. Otopina realnog uzorka.....	35
3.1.6. Otopina za određivanje NAC-a prema metodi koja propisuje farmakopeja .....	36
3.2. Instrumenti i uređaji .....	37
3.3. Određivanje NAC-a metodom koju propisuje farmakopeja.....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Optimizacija sustava.....	40
4.1.1. Optimizacija pH-vrijednosti .....	41
4.1.2. Optimizacija molnog omjera BCS i Cu <sup>2+</sup> .....	42
4.1.3. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine .....	44
4.1.4. Optimizacija volumnog protoka otopine reagensa .....	45
4.1.5. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita .....	46
4.1.6. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice.....	47
4.2. Linearno dinamičko područje.....	49
4.2.1. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	51
4.3. Točnost (iskoristivost).....	53
4.4. Utjecaj interferirajućih vrsta.....	54
4.5. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala) .....	55
4.6. Doseg (potpunost) reakcije.....	58
4.7. Primjena razvijene metode na analizu realnog uzorka .....	59
4.7.1. Analiza realnog uzorka: FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu .....	59
4.7.2. Analiza realnog uzorka: FLUIMUKAN 200 mg, šumeće tablete .....	60
5. RASPRAVA.....	63
6. ZAKLJUČAK .....	67
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	69
8. SAŽETAK.....	74
9. SUMMARY .....	76
10. ŽIVOTOPIS .....	78

## ***Zahvala***

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun na predloženoj temi diplomskog rada, stručnim savjetima i prenesenom znanju.*

*Iskreno hvala dr. sc. Maji Biočić na velikoj pomoći prilikom rada u laboratoriju, strpljenju te uloženom trudu i vremenu.*

*Hvala roditeljima Branki i Neni te cijeloj obitelji na razumijevanju i potpori koje su mi pružili tijekom cjelokupnog obrazovanja.*

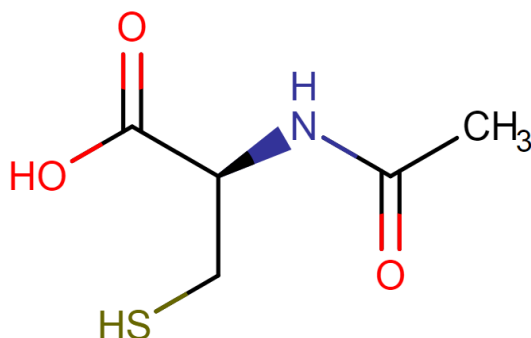
*Na kraju, hvala prijateljima i kolegama, pogotovo Tomi i svim Gjadnima, koji su uvijek bili uz mene i učinili studiranje nezaboravnim.*

## **1. UVOD**



## 1.1. *N*-acetyl-L-cistein

*N*-acetyl-L-cistein sintetski je derivat endogene aminokiseline L-cisteina. Danas se često koristi u farmaciji zbog svog sekretolitičkog i sekretomotoričkog djelovanja u dišnom sustavu, ali i kao protuotrov kod otrovanja paracetamolom. Poznat je i pod nazivima NAC, *N*-acetilcistein, acetilcistein te po IUPAC nomenklaturi (2*R*)-2-acetamido-3-sulfanilpropanska kiselina [1, 2].



Slika 1.1. Strukturna formula *N*-acetyl-L-cisteina [3]

### 1.1.1. Kemijska svojstva

*N*-acetyl-L-cistein bijeli je i kristalični prašak molekulske formule C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S. Blago kiselog je mirisa i gorkog okusa. Molna masa NAC-a iznosi 163,2 g mol<sup>-1</sup>. Talište mu je na temperaturi od 109,5 °C. Topljiv je u vodi, etanolu, vrućem izopropilnom alkoholu, metil-acetatu i etil-acetatu. Netopljiv je u eteru i kloroformu. Stabilan je na dnevnom svjetlu i na temperaturi do 120 °C te nije higroskopian. Konstanta disocijacije *N*-acetyl-L-cisteina p*K*<sub>a</sub> iznosi 3,24 [1].

### 1.1.2. Farmakokinetika

*N*-acetyl-L-cistein primijenjen oralno vrlo se brzo i gotovo potpuno apsorbira iz probavnog sustava, a najveću tkivnu koncentraciju doseže u jetri, bubrezima i plućima. Ima izražen učinak prvog prolaska kroz jetru, pa je biodostupnost oralno primijenjenog NAC-a mala (približno 10 %). Brzo se metabolizira u jetri do farmakološki aktivnog metabolita cisteina, diacetilcistina, cistina i drugih miješanih disulfida. Metaboliti mogu biti slobodni, vezani za proteine slabim disulfidnim vezama ili ugrađeni u aminokiseline. Većinom se izlučuje preko

bubrega u obliku neaktivnih metabolita. Nakon 1 do 3 sata postiže se najviša koncentracija u plazmi. Vrijeme polueliminacije oralno primijenjenog *N*-acetil-L-cisteina je 1 sat, dok nakon intravenske primjene iznosi 30 – 40 minuta [4, 5].

### **1.1.3. Farmakodinamika**

*N*-acetil-L-cistein ostvaruje svoje mukolitičko djelovanje preko sulfahidrilne skupine koja cijepa disulfidne veze mukopolisaharidnih lanaca. Time se depolimeriziraju lanci DNA u gnojnoj sluzi, pa dolazi do smanjenja viskoznosti bronhalnog sekreta i olakšanog iskašljavanja [3].

Druga važna upotreba *N*-acetil-L-cisteina je kod teškog otrovanja paracetamolom. Pri tome se najčešće koriste parenteralni oblici ovoga lijeka. U prevelikim dozama paracetamola dolazi do zasićenja dvaju glavnih metaboličkih putova glukuronidacije i sulfokonjugacije što dovodi do stvaranja hepatotoksičnog metabolita *N*-acetil-*p*-benzokinonimina. NAC metabolizmom prelazi u L-cistein koji je prekursor glutationa, tvari potrebne za inaktivaciju štetnog metabolita paracetamola. Osim što povećava sintezu glutationa, NAC veže slobodne kisikove radikale preko SH-skupine i tako ostvaruje antioksidativni učinak [3, 6].

Različite studije pokazale su da *N*-acetil-L-cistein ima učinak kao adjuvantna terapija kod neurodegenerativnih bolesti [7], HIV infekcije [8] i različitih dermatoloških stanja [9]. Ograničeni dokazi ukazuju na potencijalnu korisnost NAC-a kod mišićnog umora [10], a koristi se i kao mukolitik za razgradnju bakterijskog biofilma kod vaginoza [11].

### **1.1.4. Farmaceutski oblici**

*N*-acetil-L-cistein nalazi se u bezreceptnom režimu u obliku oralne otopine za djecu, granula za oralnu otopinu, oralnog praška u vrećici te šumećih tableta. Kao antidot pri trovanju paracetamolom koristi se parenteralni oblik koji je na bolničkoj listi lijekova [12].

### **1.1.5. Kontraindikacije i mjere opreza**

Upotreba pripravaka s *N*-acetil-L-cisteinom ne preporučuje se djeci mlađoj od 2 godine i lakšoj od 14 kg. Također, ne smije se davati osobama koje su preosjetljive na djelatnu ili pomoćne tvari u komercijalnom pripravku. Oprez je potreban kod bolesnika s astmom jer može dovesti do bronhospazma, ali i kod pacijenata s peptičkim ulkusom u anamnezi. Zbog utjecaja NAC-a na metabolizam histamina, potreban je povećan oprez kod osoba s razvijenom netolerancijom na histamin jer može doći do svrbeža, glavobolje i vazomotornog rinitisa [4, 5].

### **1.1.6. Trudnoća i dojenje**

*N*-acetil-L-cistein ima FDA kategoriju rizika B u trudnoći – studije na životinjama nisu pokazale izravni ili posredni štetan učinak na fetus i njegov razvoj, ali nema kontroliranih studija u žena [13]. Prolazi kroz posteljicu. Nema dostupnih podataka izlučuje li se NAC ili njegovi metaboliti u majčino mlijeko [14]. Prema tome, potrebno je uzeti u obzir mišljenje liječnika te omjer koristi terapije za majku i rizika za dijete [4, 5].

### **1.1.7. Interakcije**

Iako je neučinkovitost antibiotika za vrijeme primjene *N*-acetil-L-cisteina zabilježena samo u *in vitro* uvjetima, preporučuje se uzimati antibiotike dva sata prije ili dva sata nakon korištenja NAC-a. Također, ne smije se koristiti s antitusicima jer može dovesti do opasnog zastoja sekreta i gušenja zbog oslabljenog refleksa kašlja. Istodobna primjena s aktivnim ugljenom može dovesti do smanjene apsorpcije NAC-a. U kombinaciji s nitroglicerinom može pojačati njegov vazodilatatorni učinak. Može utjecati na rezultate kolorimetrijskog testa određivanja količine salicilata [4, 5].

### **1.1.8. Nuspojave**

Manje česte nuspojave nastale zbog upotrebe *N*-acetil-L-cisteina su glavobolja, tinitus, vrućica te probavne smetnje (abdominalni bolovi, mučnina, povraćanje, proljev, suhoća usta, štućavica). Može doći i do reakcije preosjetljivosti – svrbež, osip, urtikarija, angioedem,

bronhospazam, no vrlo rijetko dolazi do anafilaktičkog šoka. Dispepsija i bronhospazam rijetke su nuspojave. Više studija povezuje NAC sa smanjenom agregacijom trombocita i posljedičnim krvarenjem, ali klinički značaj nije potvrđen [4, 5].

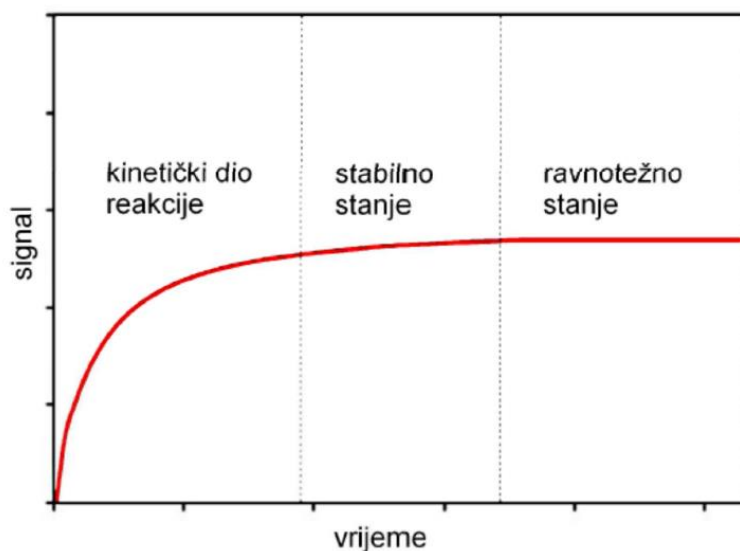
### **1.1.9. Predoziranje**

Najveća dnevna doza *N*-acetil-L-cisteina razlikuje se s obzirom na dob osobe i indikaciju te iznosi od 300 mg do 600 mg. Liječenje ne smije trajati duže od 4 – 5 dana bez odluke liječnika. Predoziranje može dovesti do gastrointestinalnih smetnji (mučnina, povraćanje, proljev), a kod djece do hipersekrecije. Liječenje je simptomatsko [4, 5].

## 1.2. Kinetičke metode analize

Kinetičke metode analize razlikuju se od ravnotežnih metoda jer se mjerenja provode pod dinamičkim uvjetima u kojima se koncentracija reaktanata i produkata mijenja kao funkcija vremena. Za razliku od njih, analitički signal ravnotežnih metoda određuje se u stanju termodinamičke ravnoteže ili barem stabilnog stanja kemijske reakcije. Pri tome su koncentracije reaktanata i produkata stalne, a signal konstantan [15,16].

Analitički parametar u kinetičkim metodama jest ili nestajanje reaktanata ili nastajanje produkata. Njihove koncentracije znatno se mijenjaju, pa se i signal mijenja s vremenom. Za većinu kemijskih reakcija vrijedi da brzina reakcije raste porastom koncentracije reaktanata [15,16].



Slika 1.2. Razdoblja odabrane kemijske reakcije [16]

U kinetičkim metodama selektivnost se postiže odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razlike u brzinama kojima analit i moguće interferencije reagiraju (nužno je da koncentracija analita određuje brzinu reakcije). U termodinamičkim metodama selektivnost se može postići odabirom reagensa i uvjeta koji povećavaju razlike u konstantama ravnoteže [16].

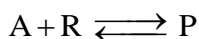
Kemijska reakcija mora zadovoljiti tri uvjeta da bi poslužila za razvoj kinetičke metode:

- brzina reakcije ne smije biti prebrza ni prespora (reakcija mora biti dovoljno brza da se odvije u razumnom vremenu, a dovoljno spora da se stanje ravnoteže ne postigne prerano);
- treba biti poznat zakon brzine reakcije (određuje se eksperimentalno);
- mora biti poznat način kontinuiranog praćenja koncentracije barem jedne vrste iz odabrane reakcije [15, 16].

Kinetičke metode značajno proširuju broj kemijskih reakcija koje se mogu koristiti u analitičke svrhe jer omogućavaju iskorištavanje presporih ili previše nepotpunih reakcija za termodinamičke uvjete [16].

### 1.2.1. Red reakcije

Kemijska reakcija može se prikazati kao:



gdje je A analit, R reagens, a P produkt.

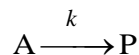
Zakon brzine kemijske reakcije međusobno povezuje brzinu reakcije s koncentracijom reaktanata i produkata u bilo kojem trenutku reakcije. Na temelju prethodno navedene reakcije, empirijski oblik zakona brzine prikazuje se kao:

$$\text{brzina} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [A]^m \cdot [R]^n$$

gdje je brzina jednaka derivaciji (promjeni) koncentracije A, R i P po vremenu,  $k$  je konstanta brzine,  $m$  red reakcije u odnosu na analit A te  $n$  red reakcije u odnosu na reagens R. Ukupni je red reakcije jednak  $p = m + n$ . Kako se analit i reagens troše za vrijeme reakcije, u izrazu im je predznak negativan [15, 16].

### 1.2.2. Zakoni brzine

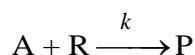
Najjednostavniji primjer reakcijske kinetike jest spontano nepovratno nestajanje vrste A, što se može prikazati kao:



Reakcija je prvog reda u odnosu prema A, pa izraz za zakon brzine reakcije glasi:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]$$

No, takve reakcije nisu karakteristične ni iskoristive u analitičkoj kemiji. Većina se analiza temelji na reakcijama u kojima sudjeluju najmanje dvije kemijske vrste: analit i reagens. Izrazi za takve zakone brzine vrlo su složeni, pa su jedine upotrebljive kinetičke metode one koje omogućuju pojednostavljenje složenih zakona brzina kemijskih reakcija u oblik jednadžbe za reakciju prvoga reda. Takve se reakcije nazivaju reakcijama pseudoprvog reda [15, 16].



Uz pretpostavku da je reakcija nepovratna i da se odvija u jednom temeljnom koraku te da je prvog reda u odnosu prema svakom od reaktanata ( $m = 1$ ,  $n = 1$ ), brzina se može prikazati kao funkcija promjene koncentracije npr. analita A po vremenu:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [R]$$

Ako je koncentracija reagensa R značajno veća od analita A, onda se može zaključiti da [R] praktički ostaje nepromijenjen. Stoga, može se pisati da je  $k \cdot [R] = \text{konstanta} = k'$ , a novi izraz za brzinu reakcije glasi:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k' \cdot [A]$$

gdje brzina ovisi o koncentraciji samo jednog reaktanta (analita), pa kažemo da je reakcija pseudoprvog reda s obzirom na analit [15, 16].

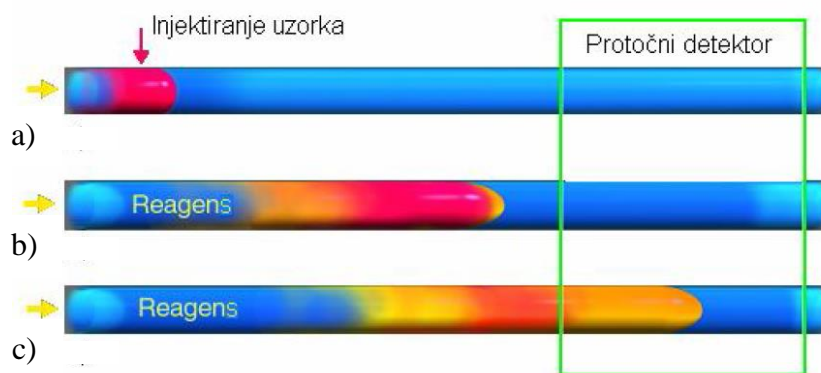
Reakcije su rijetko potpuno nepovratne čime se uvodi mala pogreška pretpostavkom o ponašanju prema pseudoprvom redu. Pogreška povezana s pretpostavkom suviška reagensa smatra se prihvatljivom [15, 16].

### 1.3. Protočna analiza injektiranjem (FIA)

Jaromir Ružička i Elo Harald Hansen 1975. godine prvi su opisali metodu protočne analize injektiranjem. Time je osmišljena nova tehnika koja je ostavila značajan trag u modernoj analitičkoj kemiji zbog svoje jednostavnosti i automatizacije u kemijskoj analizi [17].

Protočna analiza injektiranjem (engl. *Flow Injection Analysis* – FIA) kinetička je tehnika analize jer se signal mjeri u trenutku kada reakcija nije ušla u stanje termodinamičke ravnoteže. Temelji se na ubrizgavanju otopine uzorka u kontinuirani tok osnovne otopine koja služi kao nositelj. Ona može biti inertna ili je i sama reagens. Injektirani uzorak tvori zonu i prenosi se sustavom cjevčica prema detektoru. Dolazi do kemijske reakcije između analita i reagensa čime nastaje produkt. On dolazi na detektor koji kontinuirano bilježi apsorbanciju ili neki drugi parametar tijekom prolaska uzorka kroz protočnu ćeliju (kivetu) [18, 19].

Na slici 3.1. prikazan je pojednostavljeni oblik protočne analize injektiranjem. Zona injektiranog uzorka (crvena boja) prolazeći kroz sustav cjevčica ulazi u reakciju s reagensom (plava boja; na slici je osnovna otopina ujedno i reagens). Time u sustavu dolazi do dva kinetička procesa. Prvi je fizikalni proces raspršenja, tj. disperzije zone uzorka. Drugi je kemijski proces formiranja detektibilnih vrsta – na granici zone uzorka i reagensa dolazi do formiranja produkta kemijske reakcije (žuta boja) [19].

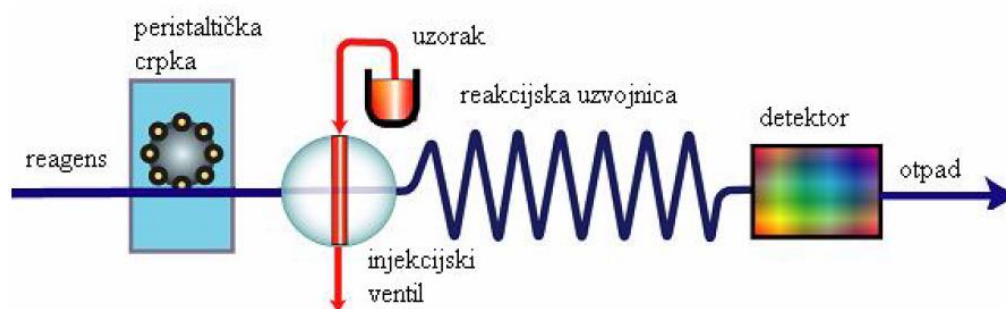


Slika 3.1. Protočna analiza injektiranjem: a) injektiranje uzorka i formiranje zone uzorka; b) raspršenje zone uzorka i kemijska reakcija; c) formiranje produkta kemijske reakcije i detekcija [19]



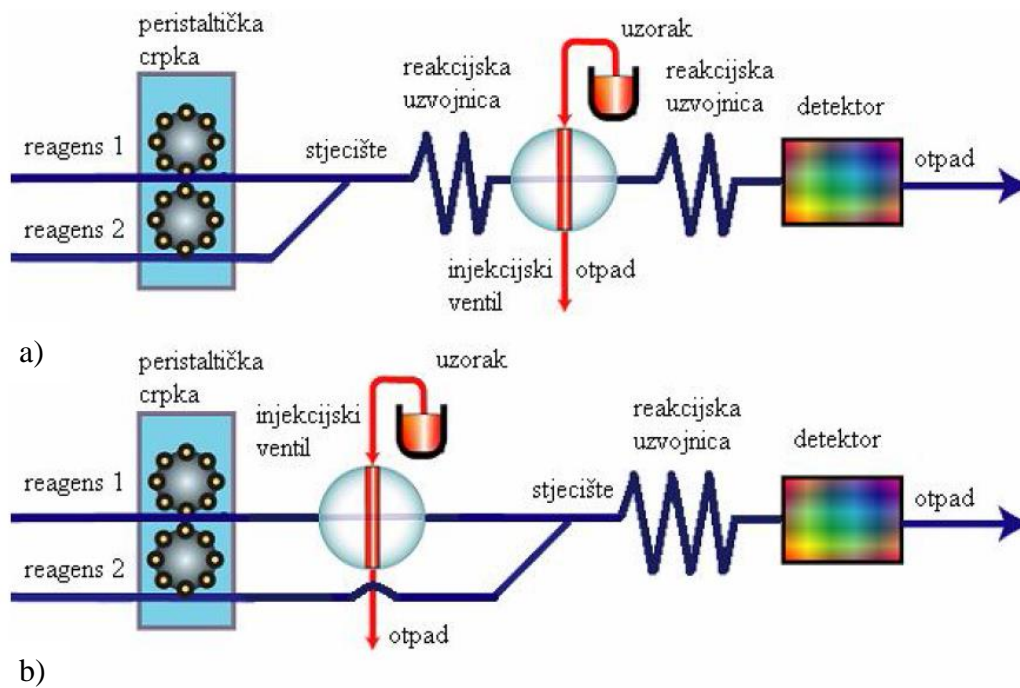
### 1.3.1. Izvedbe FIA sustava

Postoji više izvedbi FIA sustava. Najjednostavniji je jednokanalni sustav čija je shema prikazana na slici 3.2. Peristaltička crpka osigurava kontinuirani protok reagensa koji služi i kao struja nosioca (osnovna otopina) i kao vrsta koja ulazi u reakciju s uzorkom. Preko ventila vrši se injektiranje određenog volumena uzorka u struju osnovne otopine. Reagens i uzorak zajedno prolaze kroz reakcijsku uzvojnica gdje se odvija kemijska reakcija. Dolazi do formiranja produkta mjerljivog na detektoru. Ovakav se FIA sustav najčešće koristi za izravne analize kod kojih nije potrebna kemijska reakcija, nego osnovna otopina služi za ponovljivi i brzi prijenos uzorka do detektora. Može se koristiti i za analize kod kojih dolazi do kemijske reakcije. Osnovna otopina tada ima ulogu nosioca, ali i vrste koja reagira s uzorkom [19, 20].



Slika 3.2. Shema jednokanalnog FIA sustava [19]

Najčešće su korišteni dvokanalni sustavi. Oni omogućavaju bolju razinu kontrole miješanja reagensa, a posljedično i interakcije između reagensa i uzorka. Na slici 3.3. prikazane su dvije moguće izvedbe. Slika 3.3. a) prikazuje dvokanalni sustav u kojem dolazi do injektiranja uzorka neposredno nakon spajanja struja dvaju reagensa u stjecištu. Ovaj se oblik FIA sustava koristi kod nestabilnih reagensa, odnosno zbog njihove reaktivnosti nakon miješanja. Slika 3.3. b) prikazuje dvokanalni sustav u kojem se uzorak injektira u struju reagensa, a zatim se struja tog reagensa s uzorkom i struja drugog reagensa susreću u stjecištu. Ovaj se oblik koristi kod kvantitativne analize mnogih uzoraka [19, 20].



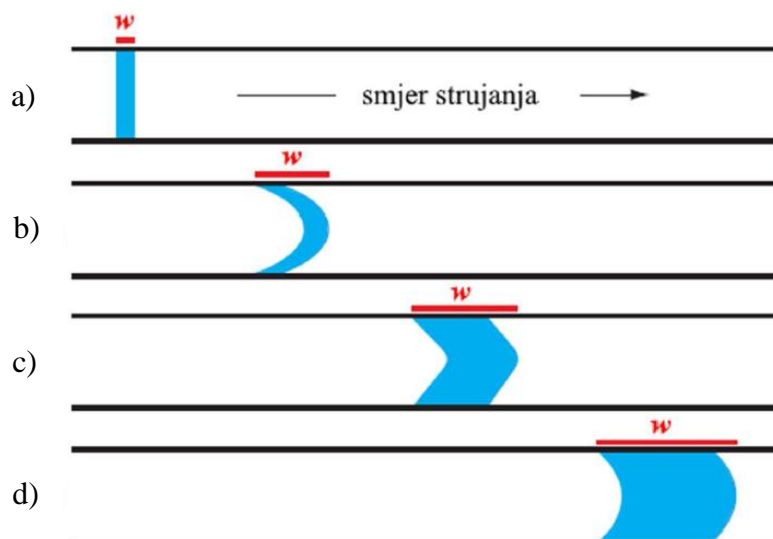
Slika 3.3. Shema dvaju različitih dvokanalnih FIA sustava koji se razlikuju s obzirom na mjesto injektiranja uzorka [19]

U upotrebi su i složeniji sustavi s tri ili više kanala (npr. trokanalni FIA sustav s dva stjecišta). Ovakvi se oblici sustava najčešće koriste za reagentse koji su nestabilni nakon miješanja [18, 19].

### 1.3.2. Disperzija uzorka

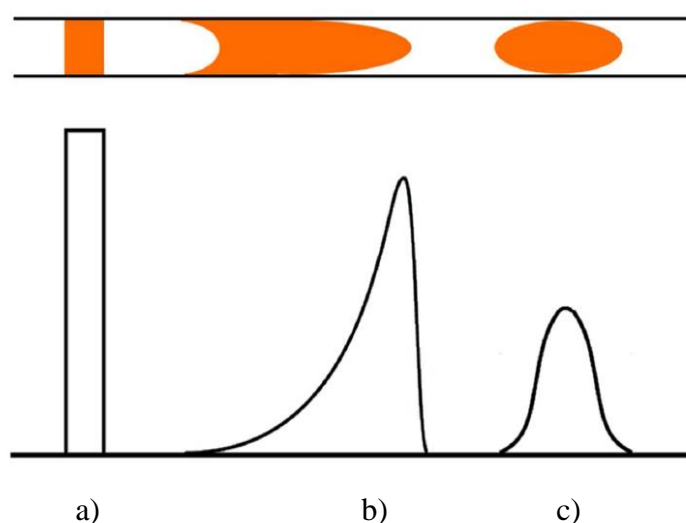
Uzorak se injektira u struju osnovne otopine i formira pravokutni oblik širine  $w$  (slika 3.4. a). Prolazeći kroz sustav cjevčica, raste i širina zone uzorka jer dolazi do disperzije (raspršenja). To je složeni proces pri kojem dolazi do promjene oblika zone uzorka zbog same dinamike fluida [20].

Disperzija, tj. raspršenje posljedica je dvaju procesa: konvekcije i difuzije. Konvekcija nastaje zbog laminarnog strujanja osnovne otopine. U tim je uvjetima brzina uzorka uz stijenke cjevčice jednaka nuli, dok je u sredini dvostruko veća od brzine osnovne otopine. Rezultat je zona uzorka paraboličnog oblika. Konvekcija je dominantni oblik disperzije u prvih 100 ms nakon injektiranja uzorka (slika 3.4. b). Difuzija nastaje zbog koncentracijskog gradijenta analita koji se formira između uzorka i osnovne otopine. Ona se odvija paralelno (aksijalno) i okomito (radijalno) na smjer kretanja otopine nositelja. No, samo je okomita difuzija bitna za raspršenje zone uzorka. Ona omogućuje smanjenje linearne brzine uzorka u sredini, a povećanje linearne brzine uz stijenke cjevčice. Time je osigurana cjelovitost zone uzorka. Konvekcija i difuzija zajedno doprinose disperziji otprilike 3 – 20 s nakon injektiranja uzorka (slika 3.4. c). Nakon 25 s difuzija je dominantni oblik disperzije (slika 3.4. d) [20].



Slika 3.4. Utjecaj disperzije na zonu uzorka: a) u trenutku injektiranja; b) konvekcija je dominantni oblik disperzije; c) konvekcija i difuzija zajedno doprinose disperziji; d) difuzija je dominantni oblik disperzije [19]

Na slici 3.5. prikazan je utjecaj disperzije na oblik analitičkog signala. Injektiranjem uzorka u struju osnovne otopine formira se pravokutni oblik. Slijedi disperzija prvenstveno uzrokovana konvekcijom zbog čega zona uzorka poprima oštri šuplji konusni oblik s obzirom da je brzina u sredini cjevčice cilindričnog presjeka dvostruko veća od srednje vrijednosti brzine protoka, a trenje uz stijenku cjevčice dovodi do formiranja pratećeg ruba fluida. Zatim dolazi do radialne difuzije koja preoblikuje zonu uzorka u oblik valjka. Time pravokutna zona uzorka (slika 3.5. a) prelazi preko asimetrične zone (slika 3.5. b) u oblik Gaussove krivulje (slika 3.5. c) [21].

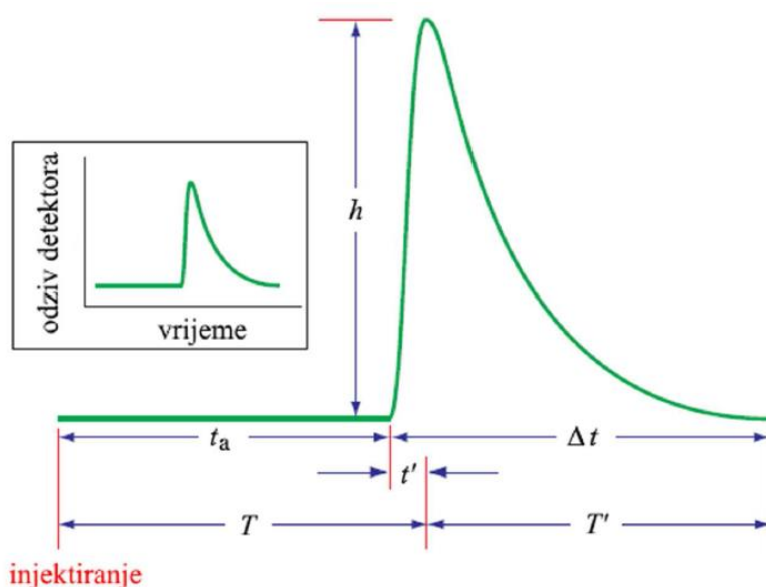


Slika 3.5. Utjecaj disperzije zone uzorka na oblik analitičkog signala [21]

### 1.3.3. Fiagram

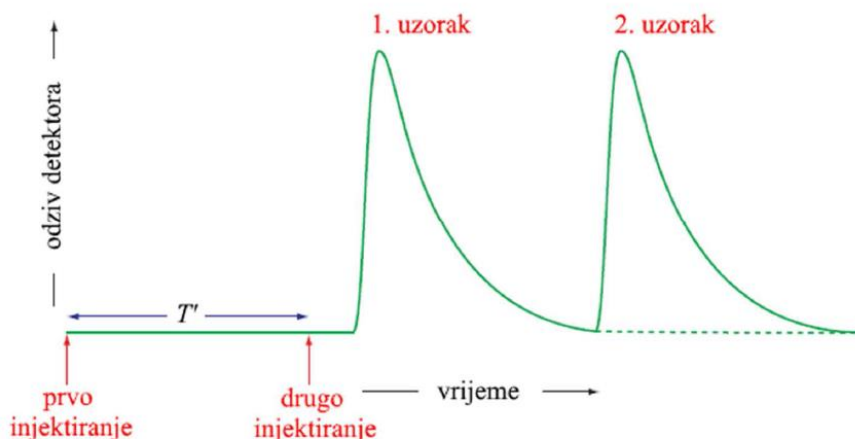
Instrumentni zapis detektora spregnutog s protočnim sustavom može se prikazati grafički u obliku fiagrama koji pokazuje signal kao funkciju vremena. Na slici 3.6. prikazani su glavni parametri kojima se opisuje fiagram. To su:

- $t_a$  – vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka na detektor, tzv. putno vrijeme;
- $T$  – vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do postizanja maksimuma signala (pika), tzv. vrijeme boravka;
- $t'$  – razlika između vremena boravka i putnog vremena ( $T - t_a$ ); ova se vrijednost približava nuli kada je konvekcija dominantan oblik disperzije, a vrijednost je veća kako doprinos difuzije postaje izraženiji;
- $\Delta t$  – vrijeme od trenutka dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka do dolaska zadnjeg oštrog dijela zone uzorka na detektor, odnosno do povratka na osnovnu liniju;
- $T'$  – vrijeme od trenutka postizanja maksimuma signala (pika) do njegovog povratka na osnovnu liniju, tzv. vrijeme povratka;
- $h$  – visina signala, tj. razlika između maksimuma signala i signala osnovne linije [20].



Slika 3.6. Fiagram s karakterističnim parametrima:  $t_a$ ,  $T$ ,  $t'$ ,  $\Delta t$ ,  $T'$ ,  $h$  [19]

Od prethodno navedenih šest parametara najvažniji su vrijeme povratka  $T'$  i visina signala  $h$ . Visina signala izravno je ili neizravno povezana s koncentracijom analita. Osjetljivost je ove metode, dakle, određena visinom signala. Vrijeme povratka pokazuje koliko često možemo injektirati uzorak, a da ne dolazi do preklapanja krivulja. Injektiranjem uzoraka u intervalima od  $T'$  postiže se maksimalan broj analiza uz minimalan broj preklapanja (slika 3.7.) [20].



Slika 3.7. Utjecaj vremena povratka  $T'$  na učestalost analiza [19]

Disperzija zone uzorka te fizikalna i kemijska svojstva FIA sustava utječu na vrijeme povratka i visinu signala. Fizikalni su parametri: volumen injektiranja; brzina protoka; duljina, promjer i oblik prijenosnog sustava (cjevčice); prisutnost stjecašta [20].

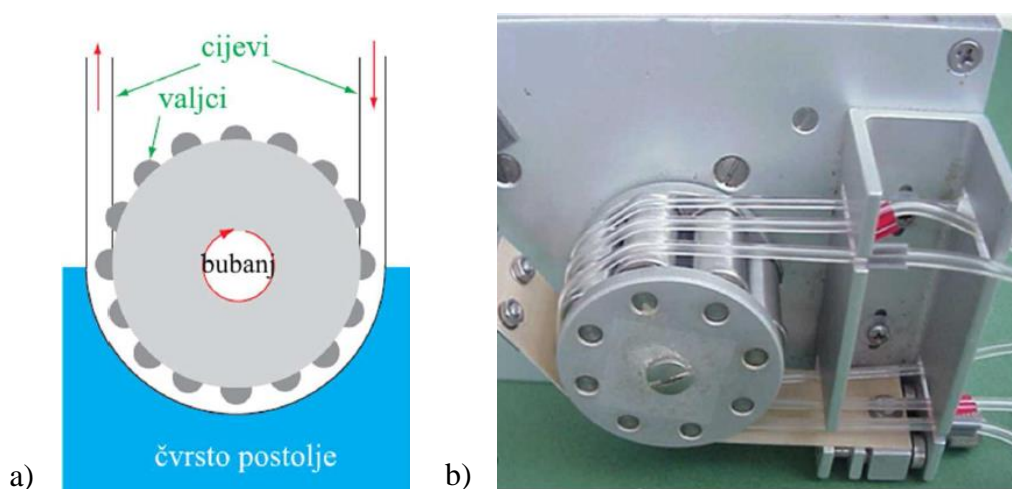
Na vrijeme povratka i visinu signala može utjecati i kinetika kemijskih reakcija između uzorka i reagensa u struji osnovne otopine. Unatoč svemu, ne postoji teorijsko razmatranje kojim bi se moglo predvidjeti vrijeme povratka i visinu signala. Potrebno je svakom analitičkom postupku pristupiti individualno i eksperimentalno utvrditi optimalne parametre sustava [20].

#### 1.3.4. Instrumentacija

Osnovna instrumentacija jednostavnog FIA sustava sastoji se od crpke koja osigurava kontinuirani protok otopine, ventila kojim se injektira točno određeni volumen uzorka, prijenosnog sustava cijevi i reaktora te protočne kivete i detektora (najčešće spektrofotometar).

#### 1.3.4.1. Crpka

Peristaltička crpka (slika 3.8.) najčešće je korištena crpka za FIA sustave. Ona omogućuje kontinuirani protok otopina kroz nekoliko paralelnih kanala [22]. Sastoji se od skupa valjaka pričvršćenih na vanjsku stranu rotirajućeg bubnja. Cjevčice koje prenose uzorak i osnovnu otopinu, odnosno reagens prolaze između valjaka i fiksne ploče. Kako se bubanj okreće, valjci stišću cijev i time potiču kretanje sadržaja cjevčica u smjeru rotacije. Ovakav tip crpki najčešće ima od 8 do 10 valjaka raspoređenih u kružnoj konfiguraciji tako da uvijek polovina broja valjaka stišće cjevčice. Takav dizajn smanjuje mogućnost pulsacija [20, 23].



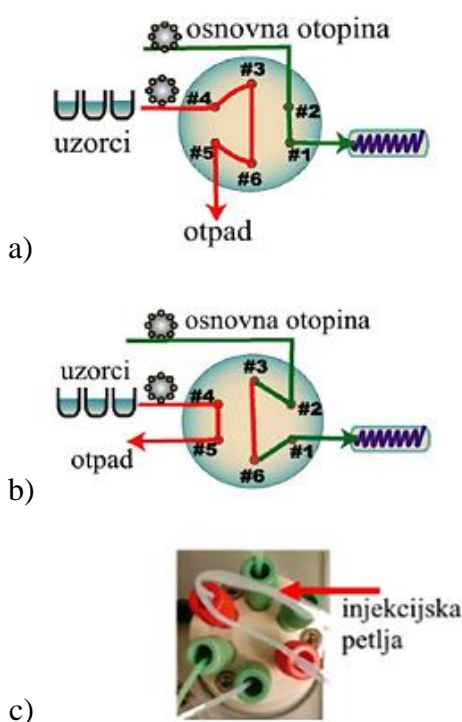
Slika 3.8. Peristaltička crpka: a) shematski prikaz; b) unutrašnjost crpke [19]

Brzina protoka podešava se brzinom rotacije bubnja i ovisi o unutarnjem promjeru cjevčica. Moguće su protočne brzine od 0,0005 do 40 mL min<sup>-1</sup>, a za potrebe FIA sustava dovoljno je od 0,5 do 2,5 mL min<sup>-1</sup>. Popularnosti peristaltičkih crpki doprinosi i njihova niska cijena. No, s vremenom dolazi do smanjenja elastičnosti cijevi i smanjene brzine protoka, pa cijena potrošnog materijala višestruko premašuje samu cijenu crpke tijekom svog vijeka trajanja. Stoga, bitno je peristaltičke cjevčice redovito mijenjati, a crpku kalibrirati. Glavni nedostatak ovih crpki su moguće pulsacije koje, pogotovo pri većim protočnim brzinama, mogu poremetiti signal [20, 22]. Korištenjem većeg broja valjaka (najmanje osam), smanjuju se pulsacije [19].

Kao crpke FIA sustava koriste se još dvosmjerne crpke s injektiranjem (engl. *syringe pump*) te dvosmjerne crpke bez injektiranja (engl. *syringe free pump*, miliGAT) [22].

### 1.3.4.2. Injekcijski ventil

Volumen uzorka za protočnu analizu injektiranjem kreće se od 50 do 1000  $\mu\text{L}$ . Bitno je da se uzorak injektira u struju osnovne otopine brzo poput hitca kako ne bi poremetio njezin protok. Najčešće se koristi injekcijski ventil sličan onome kod HPLC-a jer se može prilagoditi automatizaciji što je jako bitno kod velike količine uzoraka. Shema niskotlačnog injekcijskog ventila sa šest kanala i injekcijske petlje prikazana je na slici 3.9. [19, 20].



Slika 3.9. Shema niskotlačnog injekcijskog ventila sa šest kanala: a) pozicija punjenja petlje; b) pozicija injektiranja; c) injekcijska petlja [21]

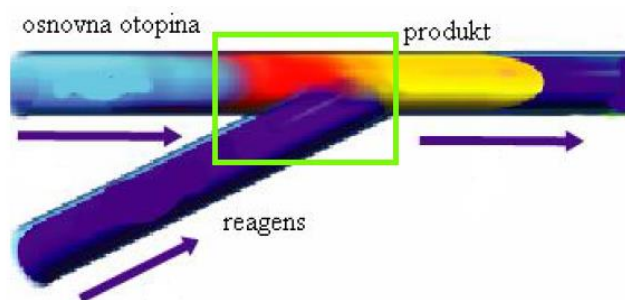
Injekcijska petlja (prikazana na slici 3.9. kao crvena linija na poziciji 3 – 6) puni se uzorkom ručno štrcaljkom ili automatski pomoću crpke. Također, ventil se može ili ručno ili automatski prebaciti iz pozicije punjenja petlje (slika 3.9. a) u poziciju injektiranja (slika 3.9. b). Duljina cjevčice između spremnika s uzorkom i ulaza u injekcijski ventil (prikazano na slici 3.9. na poziciji 4) trebala bi biti što kraća kako bi se trošilo manje uzorka. Dok je ventil zatvoren, petlja se puni, a sporednom cjevčicom kroz ventil prolazi osnovna otopina. Zakretanjem ventila za  $90^\circ$ , uzorak se injektira u protok osnovne otopine kao dobro definirana zona. Korisno je uvoditi zrak i ispirati cjevčice između uzoraka, no potreban je oprez pri provođenju idućeg uzorka kroz sustav kako ne bi sadržavao zrak ili bio razrijeđen [22, 23].



### 1.3.4.3. Prijenosni sustav

Zadatak je prijenosnog sustava transport otopina i spajanje njihovih struja u stjecištu kako bi došlo do kemijske reakcije i ostvarenja željenog signala. Koriste se cjevčice unutarnjeg promjera od 0,5 do 0,8 mm. Na raspolaganju je više materijala od kojih su izrađene prijenosne i reaktorske cijevi te stjecišta i konektori. Najčešće su od polimernih materijala, kao što su politetrafluoretilen i poli(eter-eter-keton). Može se koristiti i nehrđajući čelik zbog svojih prednosti kao što su vodljivost topline, nepropusnost plina te površinska svojstva koja smanjuju mogućnost adsorpcije tvari. Većina je cjevčica prozirna i označena bojom tako da ih možemo razlikovati pogledom. Konektori, tj. vijci i stezne matice služe za povezivanje i učvršćivanje cjevčica [22].

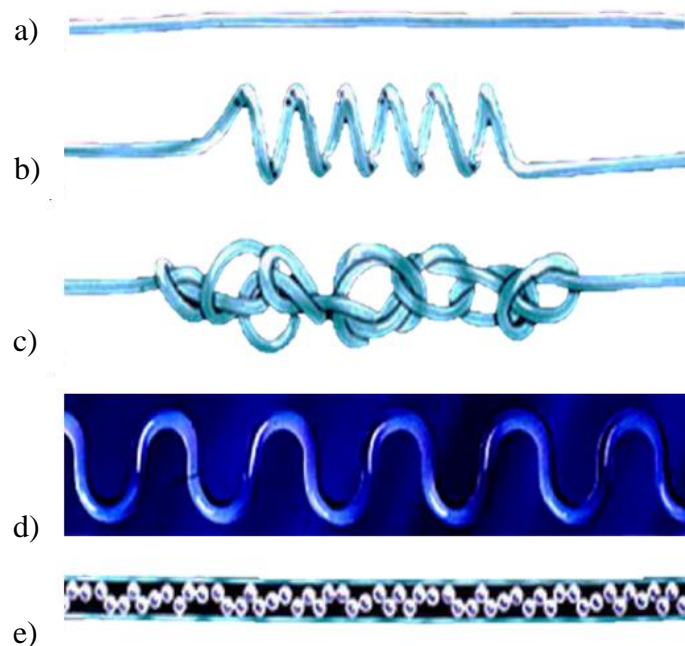
Stjecište je mjesto spajanja struje osnovne otopine s uzorkom i otopine reagensa (slika 3.10.). One dalje putuju kao konačna struja nakon čega dolazi do miješanja i stvaranja produkta u reaktorskoj cijevi [19].



Slika 3.10. Shematski prikaz stjecišta [19]

Duljina i oblik reaktorske cijevi mogu se razlikovati. Geometrijske izvedbe reaktora prikazane su na slici 3.11. To su:

- ravni reaktor – izveden kao ravna cijev; najjednostavniji, ali neučinkovit zbog slabije izraženog miješanja (slika 3.11. a);
- reakcijska uzvojnica – izvedena je namatanjem cjevčice oko valjka; miješanje je učinkovitije što je unutarnji promjer cijevi manji (slika 3.11. b);
- spleteni reaktor – izveden je vezanjem cjevčice u čvorove; miješanje je učinkovito, ali ponovljivost upitna (slika 3.11. c);
- sinusoidni reaktor – izveden je utiskivanjem cijevi u sinusoide; polukružnog je promjera, pa ostavlja dijelove koji se slabo ispiru (slika 3.11. d);
- punjeni reaktor – izveden je kao cijev napunjena inertnim kuglicama; može doći do neželjene adsorpcije analita (slika 3.11. e) [19, 22].



Slika 3.11. Različite geometrijske izvedbe reaktora za FIA sustav: a) ravni reaktor; b) reakcijska uzvojnica; c) spleteni reaktor; d) sinusoidni reaktor; e) punjeni reaktor [19, 22]

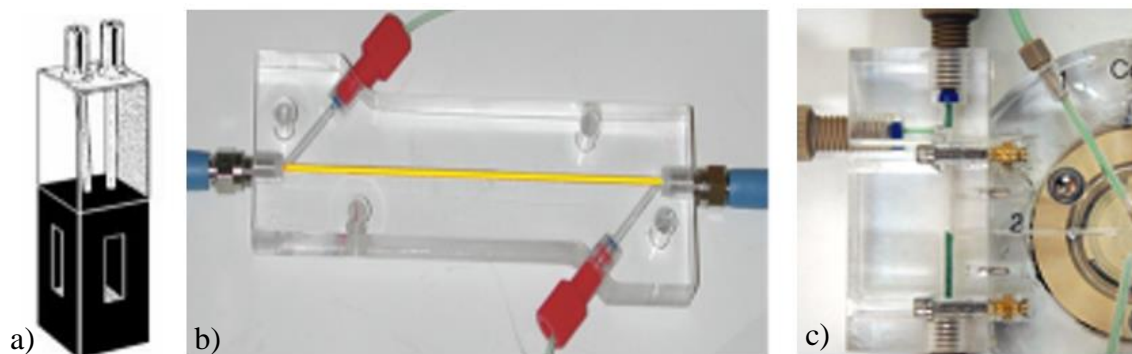
#### 1.3.4.4. Detektor

Spektrofotometrijski detektor najčešće je korišten detektor kod protočne analize injektiranjem. Upotreba optičkih vlakana dovela je do napretka u klasičnoj spektrometriji jer je olakšano postavljanje protočne kivete na željenu poziciju. Time je omogućeno mjerenje izvan samog spektrofotometra [19, 22].

Također, korištenje optičkih vlakana utjecalo je na promjenu dizajna protočnih kiveta. Klasične kivete optičkog puta 1 cm ranije su bile jedini izbor, a sada su na raspolaganju protočne kivete manjeg volumena s rasponom optičkog puta od 0,01 do 25 cm. S obzirom na geometrijsku izvedbu, razlikuju se dvije vrste protočnih kiveta:

- slobodne protočne kivete (za bilo koju vrstu analize);
- integrirane protočne kivete (engl. *Lab-on-Valve* izvedba) [22].

Primjeri slobodnih protočnih kiveta nalaze se na slici 3.12. Osim klasične kivete, danas su u upotrebi tzv. Z-kivete koje su povezane s izvorom svjetlosti i spektrofotometrom pomoću kabela s optičkim vlaknima. Integrirane protočne kivete kao dio LOV izvedbe (engl. *Lab-on-Valve* – „laboratorij na ventilu“) imaju prednost u tome što je put protoka uzorka od trenutka injektiranja do detekcije dobro definiran, a njegov volumen minimiziran [22].



Slika 3.12. Kivete: a) klasična protočna kiveta; b) Z-kiveta; c) kiveta u LOV izvedbi [22]

### 1.3.5. Primjena FIA sustava

Zbog svoje ekonomičnosti i jednostavnosti korištenja, protočna analiza injektiranjem ima široki spektar primjene. Također, ova analitička tehnika omogućuje veliki broj analiza u kratkom vremenu pomoću instrumentacije koja je lako dostupna svakom laboratoriju. FIA se, stoga, može primijeniti u poljoprivrednoj, prehrambenoj, industrijskoj i forenzičkoj analizi te istraživanju okoliša. No, značajna je njena primjena u farmaceutskoj analizi [19].

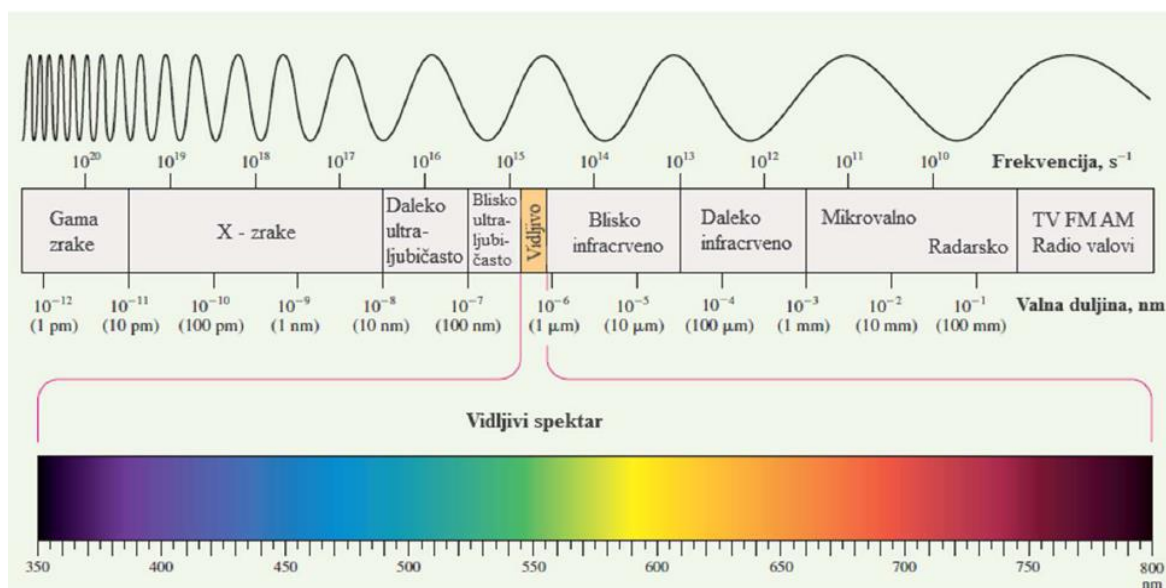
Protočna analiza injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor prilikom analize farmaceutskih pripravaka može se podijeliti na tri metode: metoda temeljena na izravnom mjerenju apsorbancije UV-VIS zračenja, metoda temeljena na kemijskoj reakciji nastajanja obojenog produkta te metoda temeljena na interakciji djelatne tvari i metala. Tako su, primjerice, razvijene metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina, kaptoprila, prometazina, klorokrezola te nekih nesteroidnih protuupalnih lijekova [19, 24].

Danas se teži razvitku ekološki prihvatljivih analitičkih metoda. FIA je u skladu s načelima „zelene analitičke kemije“ (engl. *Green Analytical Chemistry*, GAC) jer svojom izvedbom koristi male volumene reagensa, a time dovodi i do stvaranja smanjene količine otpada. Predobrada uzorka jednostavna je i brza te je omogućeno prikupljanje otpada na licu mjesta bez ometanja analize. Postupak je automatiziran pa je manje ovisan o ljudskom čimbeniku [25, 26].

## 1.4. Spektroskopija

Interakcija materije i zračenja temelj je znanosti pod nazivom spektroskopija [27]. S povijesnog gledišta, izraz spektroskopija odnosio se na granu znanosti koja je proučavala svjetlost, odnosno vidljivo zračenje razlučeno u komponente, tj. valne duljine koje su tvorile spektar [28].

Vrlo je široko područje zračenja zanimljivo za analitičku kemiju. Spektroskopske metode mogu se podijeliti s obzirom na područje elektromagnetskog spektra koji se koristi u mjerenju. To su X-zrake, ultraljubičasto (UV), vidljivo (VIS), infracrveno (IR), mikrovalno i radiofrekvencijsko zračenje. Vrste zračenja razlikuju se prema energiji (frekvenciji), odnosno valnoj duljini [27]. Vidljivo područje, ono koje se može opaziti ljudskim okom, obuhvaća jako mali dio spektra. Proteže se od ljubičastog (oko 380 nm) do crvenog područja (oko 780 nm) [28].



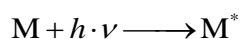
Slika 3.13. Spektar elektromagnetnog zračenja [29]

Spektrofotometrija je metoda spektrometrije koja preko količine apsorbirane svjetlosti, odnosno mjerenjem apsorbancije određuje koncentraciju analita u uzorku [27]. Ove su metode često korištene u analitičkoj kemiji zbog jednostavnog rukovanja, ekonomske prihvatljivosti i široke dostupnosti [30].

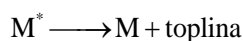
### 1.4.1. Apsorpcija zračenja

U spektrometriji, apsorpcija označava proces prigušivanja, odnosno selektivnog smanjenja intenziteta neke frekvencije elektromagnetskog zračenja [28].

Svaka elementarna čestica ima više energijskih stanja. Ono najniže energije zove se osnovno stanje. Izlaganjem tvari elektromagnetnom zračenju određene energije ( $E = h \cdot \nu$ , gdje je  $h$  Planckova konstanta  $6,63 \times 10^{-34}$  J s, a  $\nu$  je frekvencija), dolazi do pobuđivanja ili ekscitacije. Pobuđivanjem tvar prelazi u više energijsko stanje, a energija koja je to omogućila naziva se energijom pobude. Apsorpcija fotona EM zračenja jedino je moguća ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici njenih energijskih razina. Pobuđivanje  $M$  u  $M^*$  može se prikazati kao:



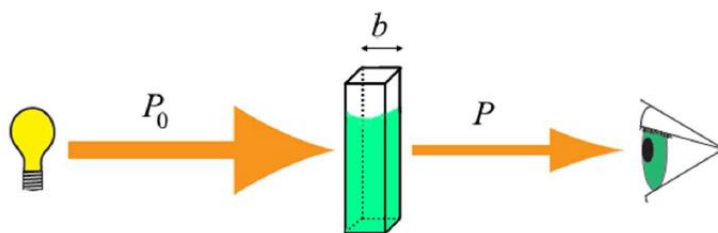
Pobuđena je vrsta nestabilna, pa se nakon kratkog vremena (od  $10^{-6}$  do  $10^{-9}$  s) vraća, tj. relaksira do nekog od nižih ili na osnovno energijsko stanje. Pritom se oslobađa energija što rezultira malim povišenjem temperature u okolini. To se može opisati kao:



Budući da je vijek trajanja ekscitirane vrste jako kratak, njezina se koncentracija može smatrati zanemarivom. Količina nastale topline također je toliko mala da se ne može ni detektirati [27, 31].

Apsorpcijski spektar koristi se za prikaz apsorpcijskih značajki pojedine vrste. To je grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja [28].

Snaga zračenja svjetlosti razlikuje se prije ( $P_0$ ) i poslije ( $P$ ) prolaska kroz uzorak, a to je rezultat apsorpcije svjetlosti.



Slika 3.14. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije [29]

Transmitancija,  $T$  ili propusnost udio je upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

gdje je  $P_0$  ulazna snaga snopa svjetlosti, a  $P$  je snaga snopa nakon apsorpcije u otopini uzorka.

Apsorbancija,  $A$  negativni je logaritam transmitancije. Ona se, za razliku od transmitancije, povećava prigušivanjem osnovnog snopa. Prikazuje se jednačinom:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

Prema prethodno navedenim jednačinama za transmitanciju i apsorbciju, njihovu vrijednost nije moguće mjeriti u laboratoriju. Naime, uzorak mora biti smješten u posudi (kiveti), pa međudjelovanje zračenja i stijenke može dovesti do refleksijskih gubitaka. Mogući su i gubici u otopini zbog raspršivanja i nehomogenosti otapala. Zbog toga se eksperimentalno provode mjerenja pomoću dvije identične posudice: u jednoj se nalazi čisto otapalo, a u drugoj otopina analita. Kroz obje posude sa sadržajem propušta se ista snaga zračenja te se prati omjer snage snopa nakon prolaska. Eksperimentalna apsorbcija može se prikazati jednačinom:

$$A = \log \frac{P_{\text{otapalo}}}{P_{\text{otopina}}} = \log \frac{P_0}{P}$$

odnosno kao logaritam omjera snage zračenja kroz otapalo i snage zračenja kroz otopinu analita [27, 28, 31].

### 1.4.2. Beerov zakon

Beerov zakon dovodi u vezu veličinu mjerenu apsorpcijskom metodom (apsorbancija,  $A$ ) i onu koja se određuje (koncentracija,  $c$ ) [27]. Stoga, može se prikazati jednadžbom:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c$$

gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti koja se zove apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  je duljina puta zračenja kroz uzorak, a  $c$  je koncentracija apsorbirajuće vrste u otopini. Apsorbancija je veličina bez dimenzija, pa se mjerna jedinica za apsorptivnost određuje iz prethodno navedene jednadžbe [28, 32].

Ako se duljina puta zračenja izrazi u cm, a koncentracija u mol L<sup>-1</sup>, onda se konstanta proporcionalnosti izražava kao L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> te se naziva molarna apsorptivnost (molarni apsorpcijski koeficijent),  $\varepsilon$ . Izraz za apsorbanciju tada se piše kao:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više tvari koje apsorbiraju zračenje. Bitno je da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta. Zbroj pojedinačnih apsorbancija jednak je apsorbanciji višekomponentnog sustava:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n$$

gdje  $n$  označava komponente 1, 2, ...  $n$  koje apsorbiraju [28, 32].

Dvije su glavne vrste ograničenja Beerovog zakona. Prva se odnosi na samu koncentraciju čestica analita jer ovaj zakon vrijedi samo za razrijeđene otopine ( $c < 0,01$  mol L<sup>-1</sup>). Pri višim koncentracijama čestice više nisu međusobno neovisne jer dolazi do smanjenja prosječne udaljenosti među njima što utječe na apsorptivnost analita. Slična se pojava javlja u razrijeđenim otopinama analita ako u otopini postoje neke druge vrste u većoj koncentraciji. Također, apsorptivnost analita ovisi o indeksu lome (refrakcije) uzorka. Povećanjem koncentracije tvari u uzorku, mijenja se indeks loma, a time i apsorptivnost. Kada je koncentracija analita dovoljno niska, indeks loma može se smatrati konstantnim [29, 31].

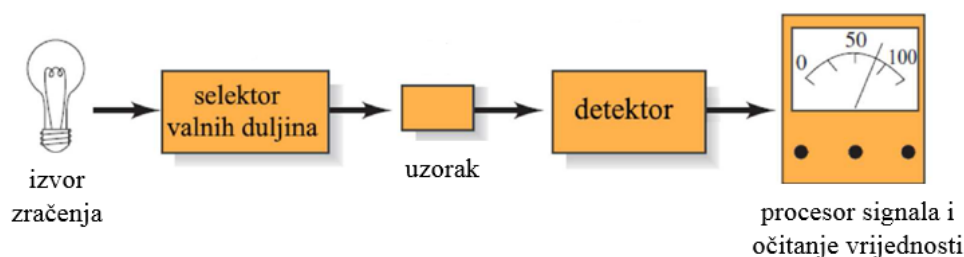
Druga vrsta su kemijska odstupanja. Ona mogu biti posljedica reakcija asocijacije, disocijacije ili reagiranja analita s otapalom. Time dolazi do nastanka produkta apsorpcijskih značajki koja se razlikuju od značajki analita [29, 31].



### 1.4.3. Instrumentacija

Većina spektrofotometara ima pet osnovnih dijelova:

- stabilan izvor zračenja;
- selektor valnih duljina;
- spremnik za uzorke;
- detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljivi signal;
- procesor signala i uređaj za očitavanje [28].



Slika 3.15. Instrumentacija za apsorpcijska mjerenja [29]

#### 1.4.3.1. Izvor zračenja

Izvor zračenja treba biti stabilnog, snažnog i kontinuiranog zračenja kako bi se osiguralo jednostavno mjerenje i detekcija. Koristi se više vrsta žarulja kao izvor, a one se međusobno razlikuju prema području valnih duljina koje emitiraju. Primjerice, volframova i halogena žarulja izvrstan su izbor za vidljivo i blisko infracrveno područje zbog područja valnih duljina od 350 do 2500 nm. Vodikove ili deuterijeve žarulje (od 160 do 380 nm) koriste se za emitiranje ultraljubičastog zračenja [28]. Zbog ograničenosti raspona valnih duljina zračenja izvora, u spektrofotometrima može se kombinirati i dva izvora kako bi se pokrio cijeli spektar u ultraljubičastom i vidljivom području [33].

#### 1.4.3.2. Selektor valnih duljina

Selektori se koriste za izbor određene valne duljine potrebne prilikom nekog mjerenja. Točnije, selektor omogućava izdvajanje određenog valnog područja (tzv. vrpce). Vrpca zračenja sastoji se od zračenja različitih valnih duljina koje su dulje i kraće od izabrane

(nominalne). Intenzitet zračenja u takvoj je vrpici sličan Gaussovoj raspodjeli uz najveći intenzitet izabrane valne duljine. Selektori za izdvajanje uskih vrpca zračenja su monokromatori i optički filtri [33].

Najčešći je monokromator u spektrofotometrima difrakcijska rešetka koja je po konstrukciji niz paralelnih pukotina na ravnoj ili zakrivljenoj staklenoj plohi. Odbijanjem zračenja o rešetku, nastaje lom i razdvajanje zračenja različitih valnih duljina. Drugi je oblik prizma koja, također, dovodi do rasapa zračenja po različitim kutovima u odnosu na prvotno koje pada na rešetku. Pri tome su zrcala jako bitan dio instrumenta jer mijenjaju smjer zračenja i propuštaju izabrani snop kroz izlaznu pukotinu. Optički filtri obojena su stakla koja apsorbiraju određena zračenja, a jednu ograničenu vrpcu propuštaju [33].

#### **1.4.3.3. Prostor za mjerenje**

Prostor za mjerenje sadrži držač kiveta i kivete. One su obično četvrtastog poprečnog presjeka, ali postoje i izvedbe valjkastih kiveta. Osnovni je zahtjev svih spektrofotometara da je stranica kivete na koju pada zračenje pod pravim kutom prema upadajućoj zraci i da je snop zračenja uži nego širina kivete. Izuzetno je važan i materijal od kojeg je izrađena kiveta. Kvarc se može primjenjivati u ultraljubičastom i vidljivom području, pa sve do 3000 nm u infracrvenom području. Silikatno staklo upotrebljava se u području od 375 do 2000 nm. Plastične kivete mogu se koristiti u vidljivom dijelu spektra, ali je potrebno paziti s organskim otapalima koja mogu uzrokovati oštećenja stijenke [29, 33].

Nečistoća, oštećenja i otapalo s vanjske strane kivete mogu utjecati na pogrešku u mjerenju. Otapalo može dovesti do gubitka zračenja refleksijom, a nečistoće mogu apsorbirati zračenje. Mehanička oštećenja mogu učiniti kivetu nepogodnom za mjerenje [33].

Držač kiveta ima važnu ulogu jer se njime namješta položaj kivete prema upadajućem snopu zraka. Također, moderni spektrofotometri mogu održavati temperaturu u kivetnom prostoru preko zraka ili neke tekućine koja oblaže kivetu. Protočna kiveta često se rabi u analitičkoj kemiji [33].

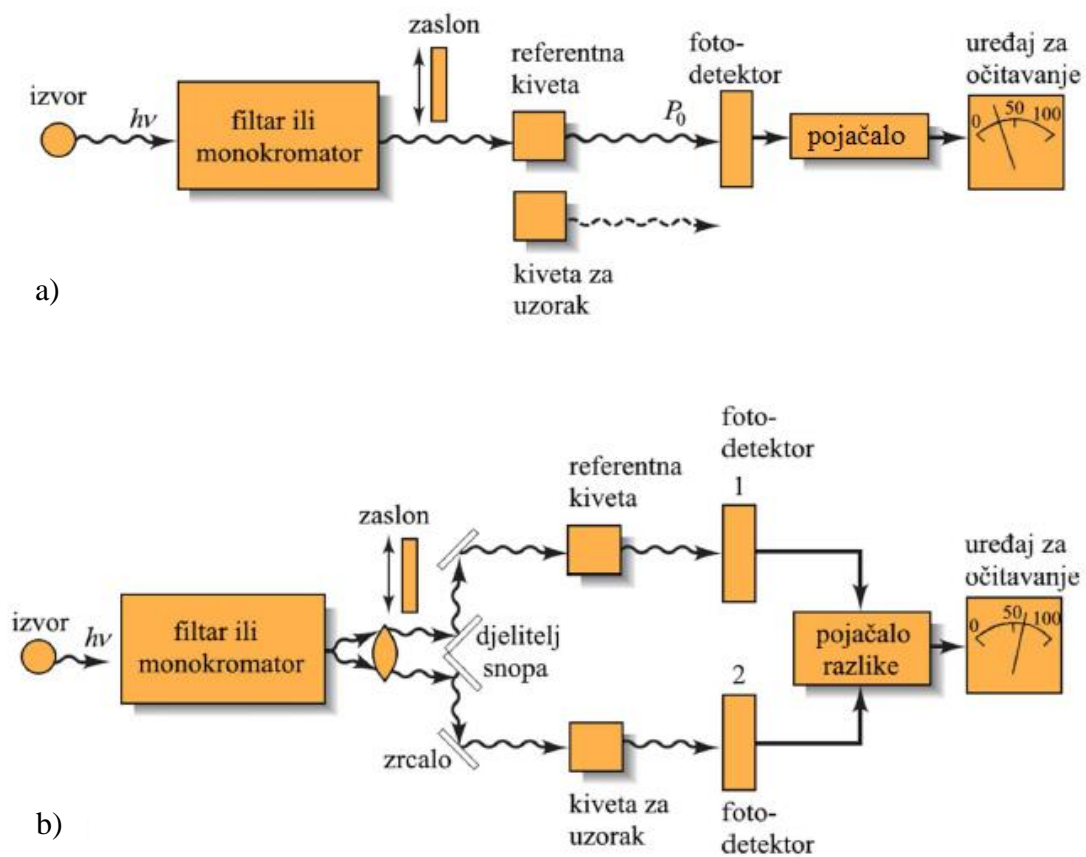
#### **1.4.3.4. Detektor i procesor signala**

Detektori su uređaji koji pokazuju postojanje neke fizikalne promjene. Udarom fotona, detektori proizvode električni signal, a odgovor je detektora funkcija valne duljine upadnog zračenja. Procesori pojačavaju električni signal iz detektora, mogu ga filtrirati i ukloniti neželjene komponente. Također, oni izvode matematičke operacije na signalu, kao što su logaritmiranje, diferenciranje i integriranje [33].

#### **1.4.3.5. Izvedbe spektrofotometra**

Spektrometar je uređaj koji bilježi snagu zračenja te je pretvara u električni signal, bilo da je riječ o apsorbiranom ili emitiranom zračenju određene vrste. Spektrofotometar je vrsta spektrometra koja mjeri apsorbanciju kao omjer snage zračenja dvaju snopova, preko koje određuje koncentraciju analita u uzorku. Većina spektrofotometara omogućuje mjerenja u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra te ponekad u bliskom infracrvenom području [27].

Postoje dvije izvedbe spektrofotometara: jednosnopni i dvosnopni. Jednosnopni su jednostavniji, ali nemaju široku primjenu jer je potrebno stalno mijenjati kivetu s uzorkom i kivetu s referentnom otopinom u držaču na mjesto dolaska snopa zračenja. Dvosnopni su češće korišteni jer omogućuju neprekidno bilježenje signala. Naime, dolazi do stvaranja dvaju snopova pomoću zrcala oblika slova V (tzv. djelitelja snopa). Jedan snop prolazi kroz referentnu otopinu prema fotodetektoru, a drugi snop kroz otopinu s analitom prema drugom fotodetektoru. Nastaju dva signala te se elektronički određuje njihov omjer [27].



Slika 3.16. Shematski prikaz spektrofotometra: a) jednosnopni; b) dvosnopni [29]

Važno je odabrati valnu duljinu maksimalne apsorbancije za spektrofotometrijsku analizu. Tada je osjetljivost mjerenja najveća, odnosno dobiva se maksimalni signal za određenu koncentraciju analita [34].

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada jest razvoj i vrednovanje metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina analizom injektiranjem u protok (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA) uz spektrofotometrijski detektor pri valnoj duljini od 483 nm. Metoda se temelji na redoks reakciji redukcije bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II) uz NAC u narančasto obojeni bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I).

Optimizacijom metode obuhvaćeni su sljedeći parametri:

- temperatura;
- pH-vrijednost;
- molni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$ ;
- volumni protok osnovne otopine,  $Q_{\text{CS}}$ ;
- volumni protok otopine reagensa,  $Q_{\text{RS}}$ ;
- volumen injektiranja otopine analita,  $V_i$ ;
- duljina reakcijske uzvojnice,  $l$ .

Korištenjem optimiziranih parametara FIA sustava, odredit će se analitičke karakteristike metode:

- linearno dinamičko područje (LDP);
- jednadžba pravca (nagib i odsječak);
- koeficijent korelacije,  $R^2$ ;
- granica dokazivanja (LOD);
- granica određivanja (LOQ).

Također, potrebno je vrednovati metodu određivanjem:

- točnosti (iskoristivosti);
- utjecaja interferirajućih vrsta;
- preciznosti (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala);
- dosega (potpunosti) reakcije.

Razvijenu i vrednovanu metodu određivanja *N*-acetil-L-cisteina protočnom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor potrebno je primijeniti za određivanje NAC-a u farmaceutskom pripravku. Rezultate analize potrebno je usporediti s rezultatima dobivenim standardnom metodom prema farmakopeji.

Postoje razne studije kojima je opisano određivanje NAC-a u farmaceutskim pripravcima i biološkim uzorcima. Pri tome je korišteno više tehnika, kao što su spektrofotometrija, titrimetrija, kromatografija, potencijometrija, voltometrija itd. No, spektrofotometrija se izdvaja od ostalih zbog svoje ekonomičnosti, jednostavnosti upotrebe i lake dostupnosti većini laboratorija [35, 36].

Kinetička spektrofotometrija ima mnoge prednosti – ona omogućuje osjetljivo i selektivno određivanje analita u kratkom vremenu uz upotrebu odgovarajućeg detektora uz minimalnu predobradu uzorka [35].

Europska farmakopeja propisuje redoks titraciju jodom kod analize farmaceutskih pripravaka s *N*-acetil-L-cisteinom [37].

### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. Priprava otopina

Sve korištene otopine pripravljene su od kemikalija analitičkog stupnja čistoće te je kod svih korištena deionizirana voda kao otapalo. Ona je pripravljena korištenjem uređaja Milli Q (Millipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska) pomoću sljedećih postupaka: reverzna osmoza, filtracija kroz aktivni ugljen (uklanjanje organskih nečistoća), deionizacija kroz kationski i anionski izmjenjivač te filtracija kroz membranski filter s porama 0,22 µm.

#### 3.1.1. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera pripremljena je otapanjem 4,9464 g borne kiseline,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Alkaloid, Skopje, Makedonija,  $M = 61,83 \text{ g mol}^{-1}$ ) u malo deionizirane vode, dodatkom 4,7980 g octene kiseline  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (VWR Chemicals, Francuska,  $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ ) i 5,4580 g fosforne kiseline  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ ) uz nadopunjavanje deioniziranom vodom do oznake u odmjernu tikvicu od 2 L. Ovako pripremljena otopina ima pH-vrijednost približno 2. Korištenjem pH-metra podešava se viša pH-vrijednost za daljnja mjerenja uz dodatak otopine natrijevog hidroksida, NaOH ( $c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.1.2. Otopina natrijeva hidroksida

Otapanjem 8,00 g natrijevog hidroksida (NaOH, GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska,  $M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 100 mL deionizirane vode pripravljena je otopina natrijevog hidroksida ( $c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.1.3. Otopina reagensa

Priprava otopine kompleksa započeta je pripravom pojedinačnih otopina. Otopina bakra(II) ( $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pripremljena je otapanjem 0,1 g bakrovog(II) sulfat pentahidrata ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska,  $M = 249,68 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 50 mL deionizirane vode. Otopina batokuproin disulfonske kiseline ( $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ )

pripremljena je otapanjem 0,05825 g dinatrijeve soli batokuproin disulfonat hidrata (Sigma-Aldrich, Njemačka,  $M = 564,54 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 50 mL deionizirane vode.

#### 3.1.4. Otopina *N*-acetil-L-cisteina (standardna otopina)

Standardna otopina *N*-acetil-L-cisteina ( $c(\text{NAC}) = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) pripremljena je otapanjem 0,0816 g *N*-acetil-L-cisteina (Acros Organics, New Jersey, USA,  $M = 163,19 \text{ g mol}^{-1}$ ) u acetatno-borato-fosfatnom puferu pH-vrijednosti 2, do oznake 50 mL u odmjernoj tikvici. Radne otopine niže koncentracije dnevno su pripravljane odgovarajućim razrjeđenjem standardne otopine deioniziranom vodom.

#### 3.1.5. Otopina realnog uzorka

Pripravljene su sljedeće otopine realnog uzorka:

- **FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu**, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska: Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži, svaka vrećica sadrži 5 g granula što odgovara 100 mg *N*-acetil-L-cisteina. Realni uzorak pripravlja se otapanjem sadržaja jedne vrećice u 100 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera ( $\text{pH} = 2$ ) nakon čega je potrebno odmjernu tikvicu dopuniti deioniziranom vodom do konačnog volumena od 500 mL. Množinska koncentracija ovako pripravljene otopine iznosi  $c_1 = 1,23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . U odmjernu tikvicu od 100 mL dodaje se 1 mL prethodno pripravljene otopine te se razrijedi do oznake. Nova množinska koncentracija otopine iznosi  $c_2 = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .
- **FLUIMUKAN 200 mg, šumeće tablete**, Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska: Prema deklaraciji navedenoj na sekundarnoj ambalaži, jedna šumeća tableta sadrži 200 mg *N*-acetil-L-cisteina. Realni uzorak pripravlja se otapanjem jedne šumeće tablete u 100 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera ( $\text{pH} = 2$ ) nakon čega je potrebno odmjernu tikvicu dopuniti deioniziranom vodom do konačnog volumena od 500 mL. Množinska koncentracija ovako pripravljene otopine iznosi  $c_1 = 2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . U odmjernu tikvicu od 100 mL dodaje se 1 mL prethodno pripravljene otopine te se razrijedi do oznake. Pri tome, nova množinska koncentracija otopine iznosi  $c_2 = 2,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Dodatkom

1 mL ovako pripravljene otopine odmjernu tikvicu od 10 mL te se razrjeđenjem do oznake dobiva nova množinska koncentracija koja iznosi  $c_3 = 2,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.1.6. Otopina za određivanje NAC-a prema metodi koja propisuje farmakopeja

Potrebno je pripremiti sljedeće otopine:

- **Otopina kalijevog jodida:** Standardna otopina ( $\gamma(\text{KI}) = 166 \text{ g L}^{-1}$ ) dobiva se otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode.
- **Otopina joda:** 12,7 g joda ( $\text{I}_2$ ) i 20 g kalijevog jodida (KI) otopljeno je u deioniziranoj vodi i razrijeđeno u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Jod je bolje topljiv u otopini jodida, pa je prvo otopljena mala količina KI te potom dodan  $\text{I}_2$ . Nakon njegovog potpunog otapanja dodana je preostala količina vode. Otopinu je potrebno zaštititi od svjetla. Množinska koncentracija ove otopine iznosi  $c = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  [37].
- **Standardizacija otopine joda:** U 20 mL prethodno navedene otopine joda ( $c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) dodan je volumen od 1 mL razrijeđene octene kiseline i 30 mL deionizirane vode. Slijedi titracija pripravljene otopine pomoću standardne otopine natrijevog tiosulfata ( $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ). Kao indikator koristi se 1 mL otopine škroba [37].
- **Otopina klorovodične kiseline R:** Pripravlja se miješanjem 17 mL 35 %-tne otopine klorovodične kiseline deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL [37].
- **Otopina škroba:** Otopina škroba ( $w(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n = 20 \% \text{ m/m}$ ) priprema se otapanjem 2 g škroba u 100 mL vruće deionizirane vode. Otopina se hlađenjem izbistri. Koristi se kao indikator [37].

### 3.2. Instrumenti i uređaji

Sustav za provođenje protočne analize injektiranjem sastoji se od sljedećih dijelova:

- peristaltička crpka s osam kanala Ismatec IPC (Ismatec, Zurich, Švicarska);
- šestopozicijski injekcijski ventil Rheodyne Model 5020 (Anachem, Luton, UK);
- prijenosni sustav od PTFE cjevčica (unutarnji promjer = 0,8 mm), petlja i stjечиšte;
- protočna kvarcna kiveta (optički put = 10 mm, unutarnji volumen = 160  $\mu$ L);
- dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan);
- osobno računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Ovaj spektrofotometar ima deuterijski i volframov izvor zračenja kako bi se pokrio cijeli spektar u ultraljubičastom i vidljivom području. Disperzno je sredstvo monokromatora difrakcijska rešetka, a detektor je fotomultiplikator. Apsorbancija se kontinuirano prati pri valnoj duljini od 483 nm.

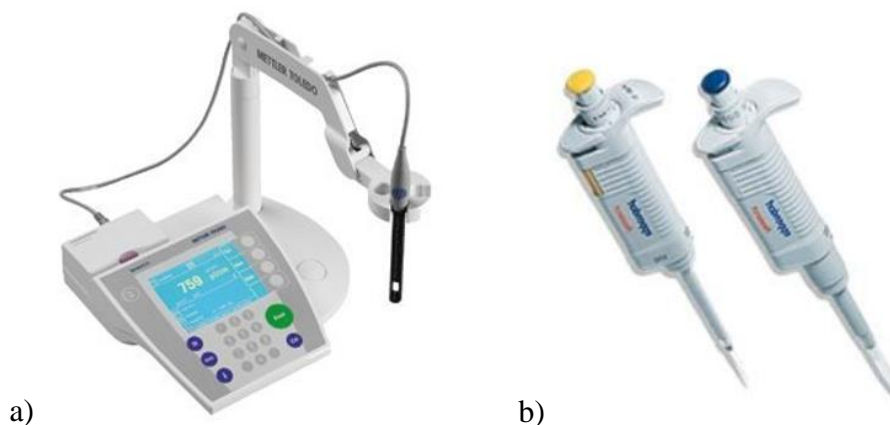
Podatci spektrofotometrijskog mjerenja kontinuirano su bilježeni i pretvarani u oblik pogodan za obradu u programu GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Pomoću navedenog programa izrađene su krivulje umjeravanja te je provedena njihova analiza i statistička obrada podataka mjerenja. Korišten je i Microsoft Office Excel u svrhu tablične obrade podataka.



Slika 3.17. Prikaz mjerne instrumentacije za određivanje *N*-acetil-L-cisteina kinetičkom spektrofotometrijskom metodom

Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen staklenom elektrodom Mettler Toledo InLab<sup>®</sup> korišten je za mjerenje pH-vrijednosti i pripremu otopina.

Mikropipete (Nichiryo, Tokyo, Japan) korištene su za dodavanje izrazito malih, mikrolitarskih volumena kod pripravljanja standardnih otopina analita, reagensa i interferencija.



Slika 3.18. Ostala korištena oprema i uređaji: a) milivoltmetar; b) mikropipete

### 3.3. Određivanje NAC-a metodom koju propisuje farmakopeja

Farmakopeja preporučuje metodu redoks titracije standardnom otopinom joda za određivanje sadržaja *N*-acetil-L-cisteina u farmaceutskim pripravcima [37].

Prema protokolu koji propisuje farmakopeja, potrebno je otopiti 0,140 g uzorka u 60 mL deionizirane vode te dodati 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline (R). Slijedi hlađenje u ledenoj vodi, nakon čega se doda 10 mL kalijevog jodida te se titrira sa 0,05 mol L<sup>-1</sup> otopinom joda do pojave intenzivno modre boje. Otopina škroba koristi se kao indikator [37].

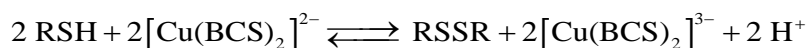
Metoda se zasniva na redoks reakciji u kojoj NAC (RSH spoj) reducira jod u jodid. To možemo prikazati reakcijom:



Ovom je metodom utvrđeno da je za 16,32 mg NAC-a potrebno utrošiti 1 mL otopine joda ( $c(\text{I}_2) = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) [37].

#### **4. REZULTATI**

Predložena metoda analize injektiranjem u protok uz spektrofotometrijski detektor temelji se na redoks reakciji redukcije bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II) uz NAC u narančasto obojeni bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Tiolna skupina NAC-a ima ulogu reducensa. Apsorpcijska meta, reakcijski produkt bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I), postiže apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 483 nm. Ostali sudionici navedene ravnoteže ne apsorbiraju pri toj valnoj duljini.



#### 4.1. Optimizacija sustava

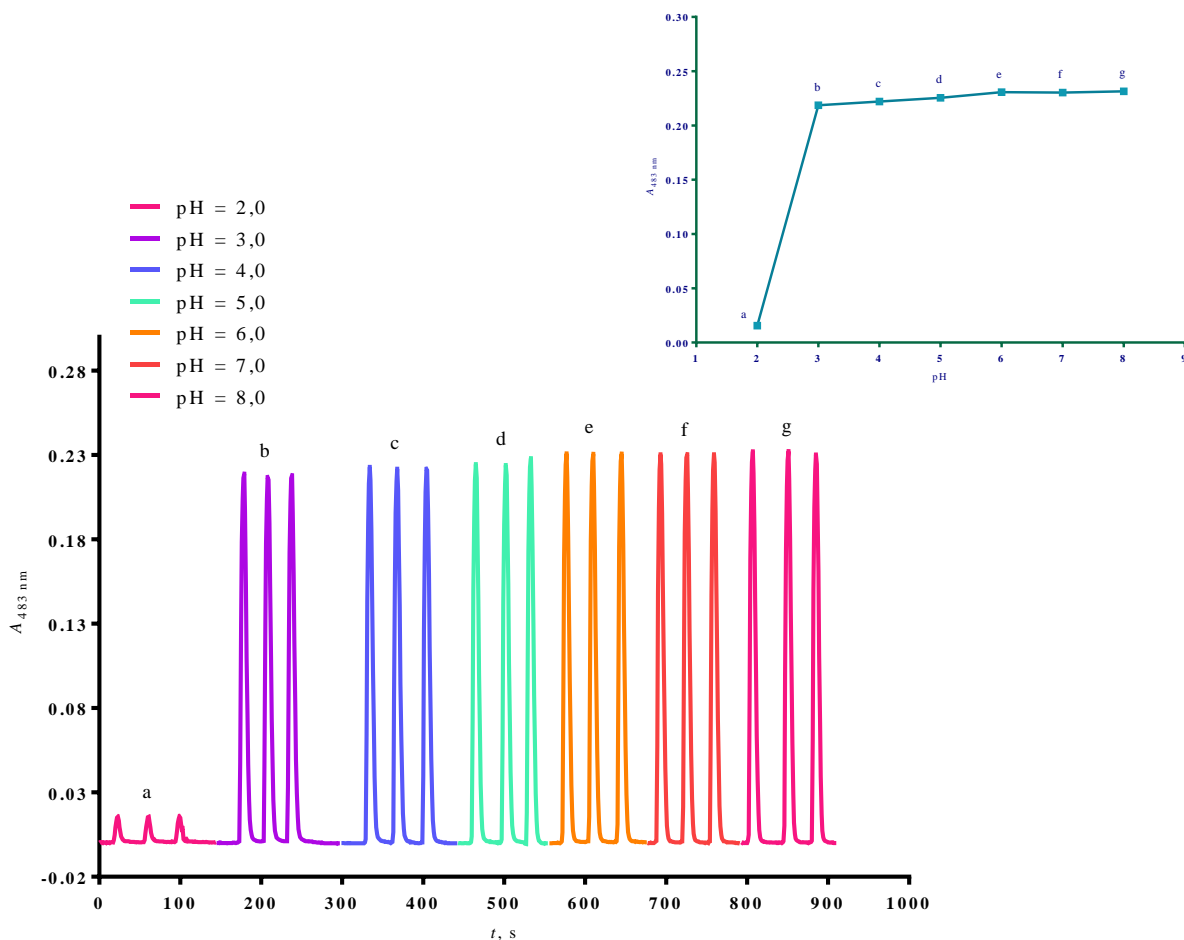
Prilikom razvoja metode provedena je optimizacija kemijskih parametara i parametara protočnog sustava. To su temperatura, pH-vrijednost, molni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$ , volumni protok osnovne otopine, volumni protok otopine reagensa, volumen injektiranja otopine analita te duljina reakcijske uzvojnice.

Korištena je univarijantna metoda – eksperimentalno se mijenja vrijednost jedne varijable, a drugi su parametri konstantni. Nakon optimizacije te varijable, ona se zadržava stalnom, a sljedeća se mijenja. Ovaj se postupak ponavlja za sve parametre. Kao optimalna vrijednost odabire se ona koja omogućuje dovoljno ponovljiv analitički signal sa stabilnom baznom linijom uz zadovoljavajuću učestalost injektiranja [38].

FIA sustav nije lako termostatirati jer je u postupku optimizacije temperature potrebno sve otopine i reakcijsku uzvojnici uroniti u vodenu kupelj kontrolirane temperature. Protočna kiveta unutar spektrofotometra nije termostatirana. Pri višim temperaturama u protočnom sustavu stvaraju se mjehurići koji mogu poremetiti mjereni signal. Autorica diplomskog rada „Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji  $\text{Cu(II)}\text{L}_n$  kompleksa. Razvoj i optimizacija metode“ proučavala je utjecaj temperature otopine uzorka na intenzitet signala u temperaturnom rasponu od 20 °C do 50 °C. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastojala se od 0,6 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , 2,4 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , 10 mL acetatno-borarno-fosfatnog pufera i 1 mL deionizirane vode. Rezultati su pokazali da je ova redoks reakcija temperaturno neovisna jer brzina reakcije i stabilnost signala ostaju nepromijenjeni u širokom temperaturnom rasponu. Iz praktičnih razloga provedbe postupka, izabrana je sobna temperatura od 25 °C koja je prihvaćena i koristit će se u ovom eksperimentu [39].

#### 4.1.1. Optimizacija pH-vrijednosti

Utjecaj pH-vrijednosti otopine ispitan je u području od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-borato-fosfatnog pufera. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastoji se od 1,0 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , 4,0 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i 20 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera. Kao osnovna otopina koristi se deionizirana voda.



Slika 4.1. Diagram optimizacije pH-vrijednosti kod određivanja NAC-a. pH-vrijednost: a) 2,0; b) 3,0; c) 4,0; d) 5,0; e) 6,0; f) 7,0; g) 8,0. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25^\circ\text{C}$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o pH-vrijednosti za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

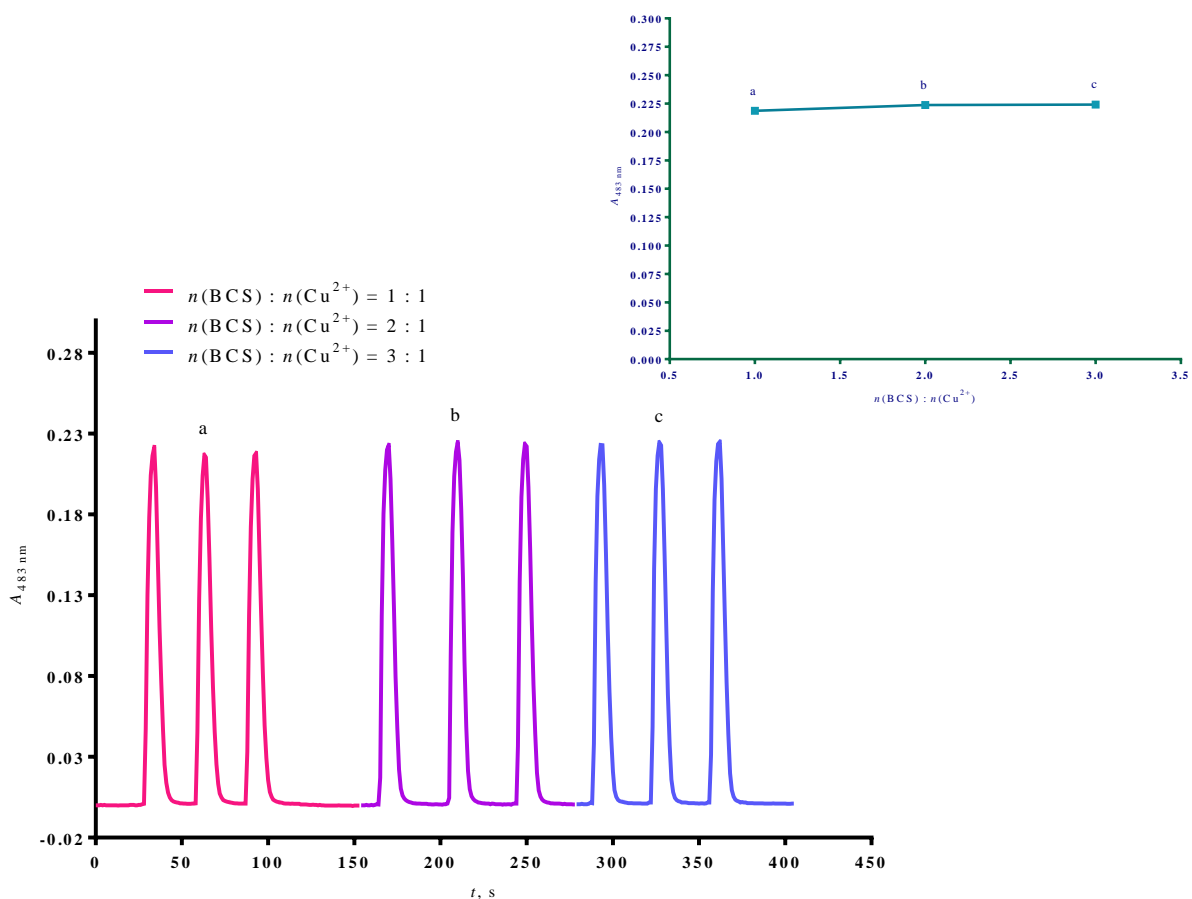


#### 4.1.2. Optimizacija molnog omjera BCS i $\text{Cu}^{2+}$

U ovom je dijelu eksperimenta optimizacije mijenjan molni omjer komponenata reakcijske otopine. Koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c(\text{Cu}^{2+}) = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) održavana je konstantnom, a koncentracija BCS-a se mijenjala od  $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  do  $9,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Stoga se molni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  mijenjao u rasponu od 1 : 1 do 3 : 1. Da bi se postigao ukupni volumen od 25 mL, volumen pufera prilagođavao se s obzirom na dodanu količinu BCS-a. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištena je kao analit. Osnovna otopina je deionizirana voda.

Tablica 4.1. Prikaz molnog omjera BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  te volumeni i koncentracije korištenih otopina

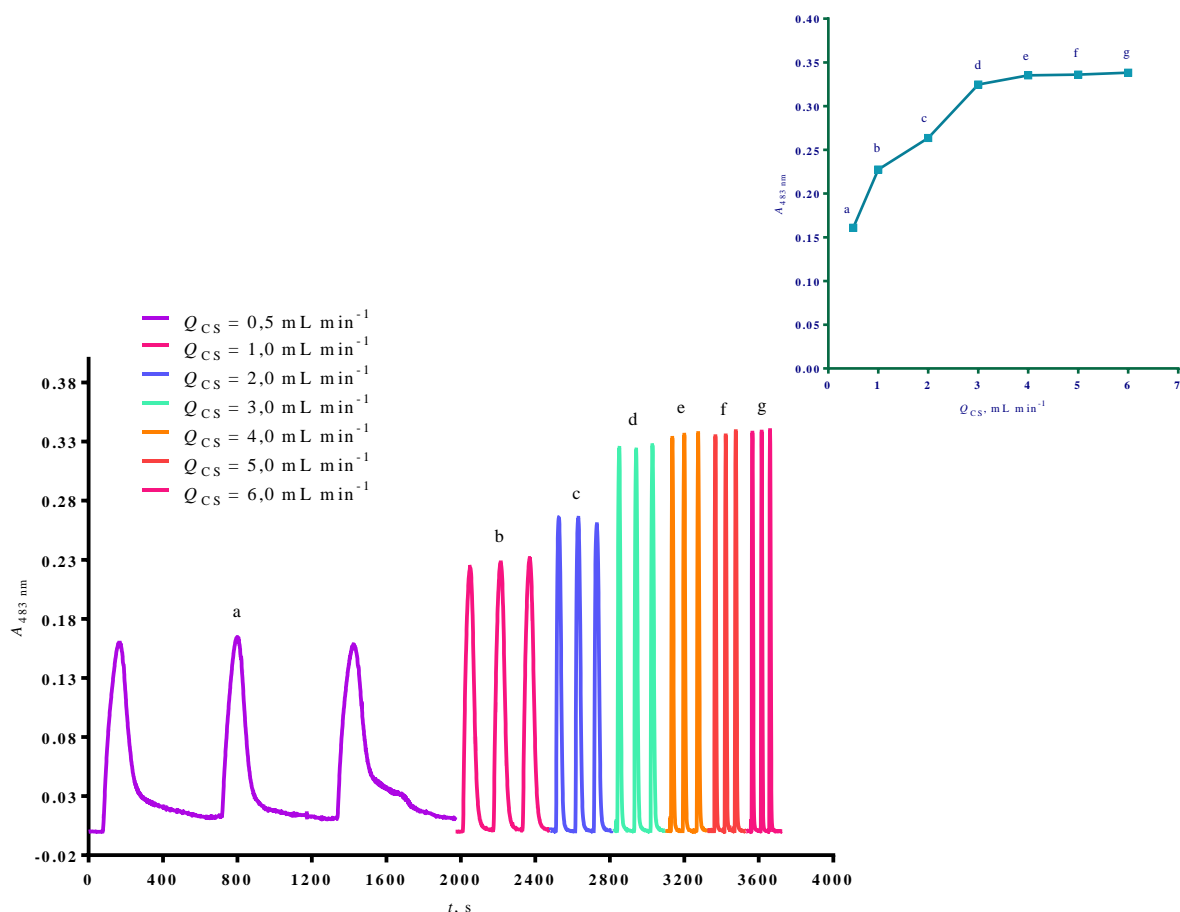
$n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$	$c(\text{BCS}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$V(\text{BCS}),$ $\text{mL}$	$c(\text{Cu}^{2+}),$ $\text{mol L}^{-1}$	$V(\text{Cu}^{2+}),$ $\text{mL}$	$V(\text{pufer}),$ $\text{mL}$
1 : 1	$3,2 \times 10^{-4}$	4,0	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	20,0
2 : 1	$6,4 \times 10^{-4}$	8,0	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	16,0
3 : 1	$9,6 \times 10^{-4}$	12,0	$3,2 \times 10^{-4}$	1,0	12,0



Slika 4.2. Fiagram optimizacije molnog omjera BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  kod određivanja NAC-a. Molni omjer,  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$ : a) 1 : 1; b) 2 : 1; c) 3 : 1. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3,0$ . Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o molnom omjeru BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

### 4.1.3. Optimizacija volumnog protoka osnovne otopine

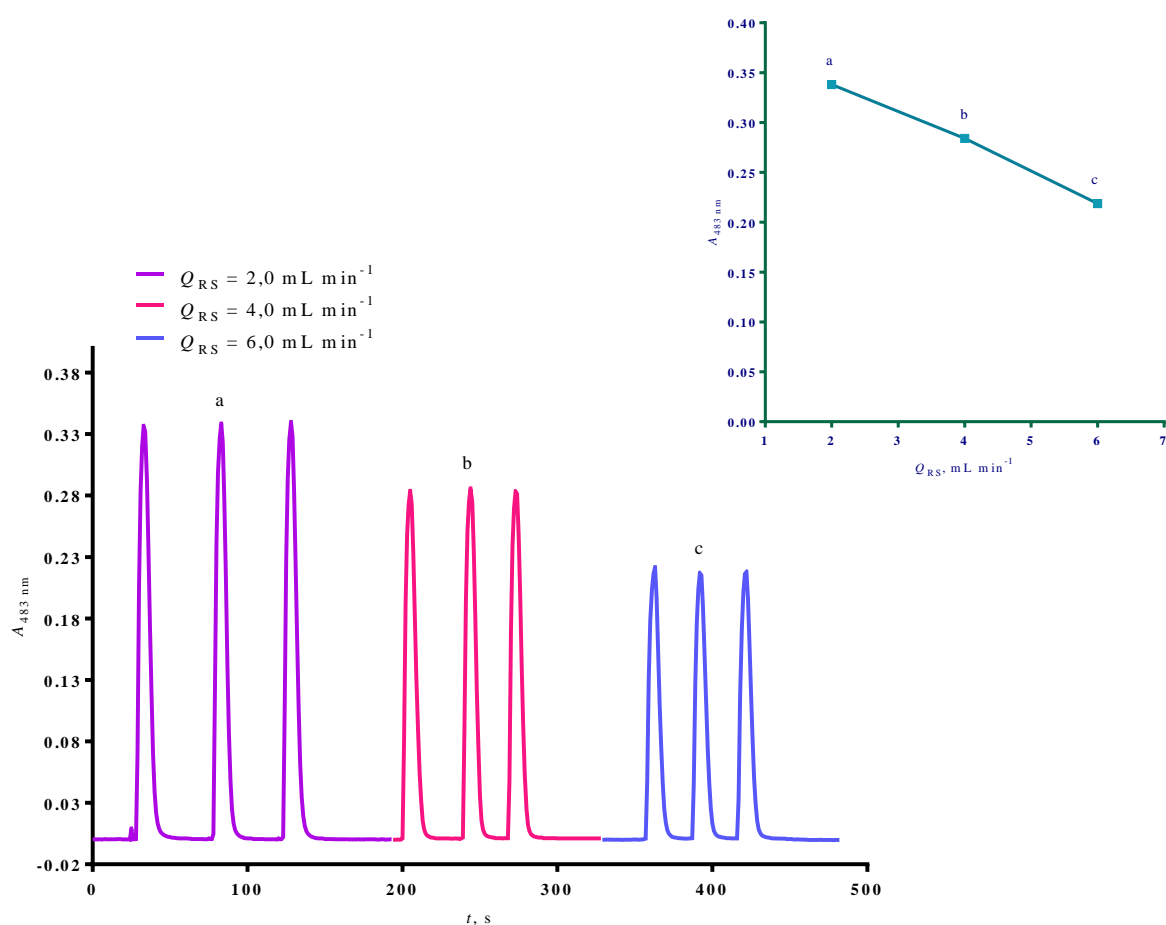
Utjecaj volumnog protoka osnovne otopine,  $Q_{CS}$  ispitan je u području od 0,5 do 6,0 mL min<sup>-1</sup> pomoću peristaltičke crpke. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastoji se od 2,0 mL otopine Cu<sup>2+</sup>,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, 8,0 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> i 40 mL acetatno-borato-fosfatnog pufera. Kao osnovna otopina koristi se deionizirana voda.



Slika 4.3. Fiagram optimizacije volumnog protoka osnovne otopine kod određivanja NAC-a. Volumni protok osnovne otopine,  $Q_{CS}$ : a) 0,5; b) 1,0; c) 2,0; d) 3,0; e) 4,0; f) 5,0; g) 6,0 mL min<sup>-1</sup>. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{RS} = 2,0$  mL min<sup>-1</sup>;  $V_i = 500$  μL;  $l = 40$  cm; volumen protočne kivete = 160 μL;  $\lambda = 483$  nm; temperatura 25 °C; pH = 3,0. Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumnom protoku osnovne otopine za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.1.4. Optimizacija volumnog protoka otopine reagensa

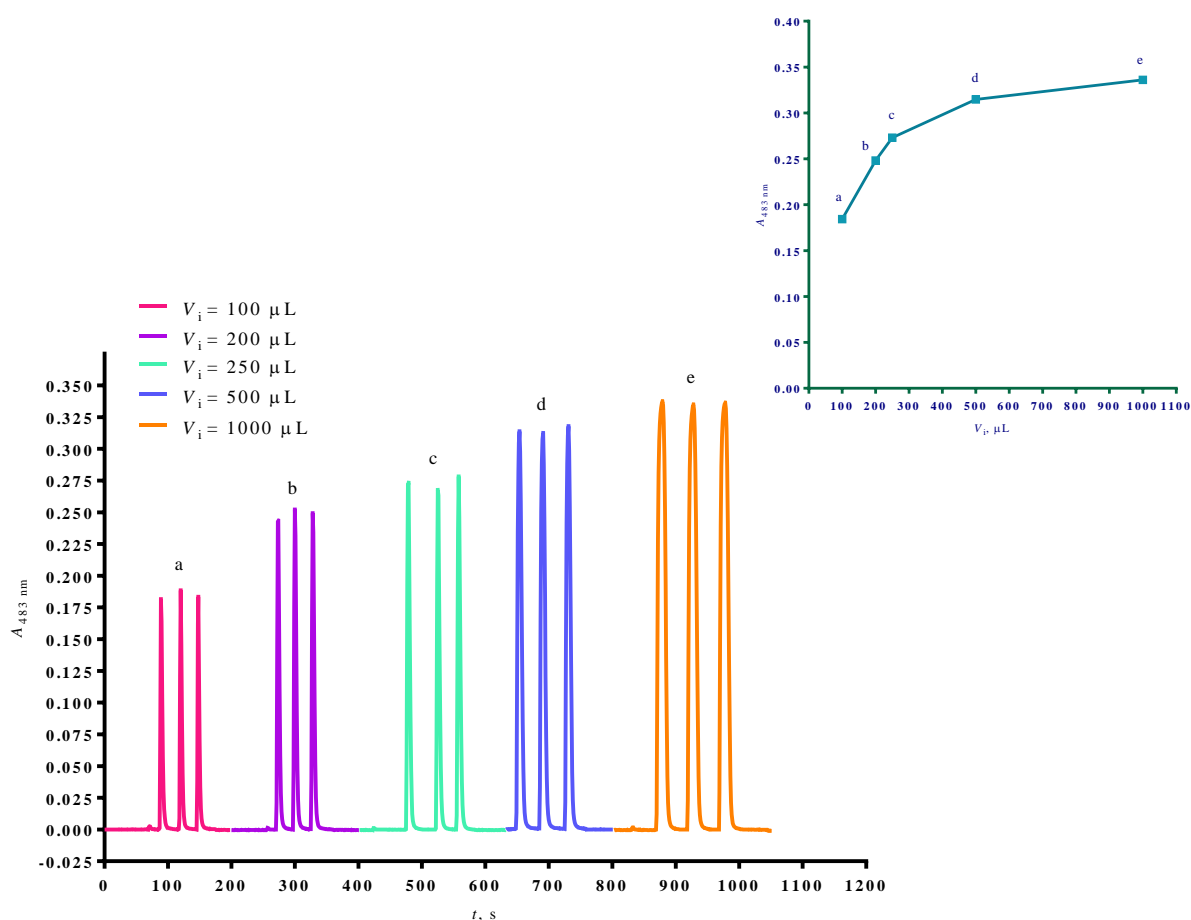
Utjecaj volumnog protoka otopine reagensa,  $Q_{RS}$  ispitan je u području od 2,0 do 6,0 mL min<sup>-1</sup> pomoću cjevčica različitog unutarnjeg promjera: *orange / white* 0,64 mm, *white / white* 1,02 mm te *gray / gray* 1,30 mm pri konstantnoj brzini crpke. Time su postignuta tri različita volumna protoka otopine reagensa: 2,0 mL min<sup>-1</sup> (uz cijev *orange / white*), 4,0 mL min<sup>-1</sup> (uz cijev *white / white*) te 6,0 mL min<sup>-1</sup> (uz cijev *gray / gray*). Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastoji se od 2,0 mL otopine Cu<sup>2+</sup>,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, 8,0 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> i 40 mL acetatno-borarno-fosfatnog pufera. Kao osnovna otopina koristi se deionizirana voda.



Slika 4.4. Fiagram optimizacije volumnog protoka otopine reagensa kod određivanja NAC-a. Volumni protok osnovne otopine,  $Q_{RS}$ : a) 2,0; b) 4,0; c) 6,0 mL min<sup>-1</sup>. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{CS} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0. Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumnom protoku otopine reagensa za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.1.5. Optimizacija volumena injektiranja otopine analita

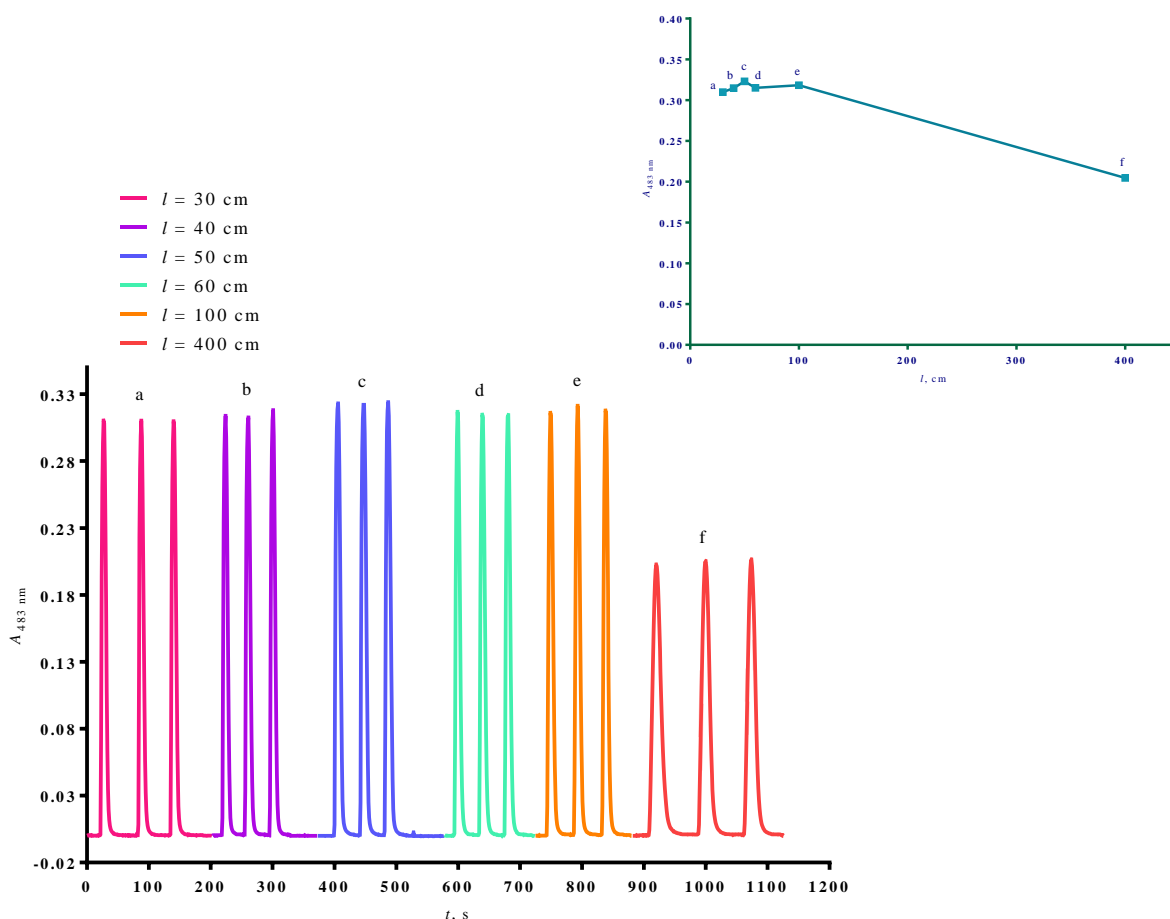
Utjecaj volumena injektiranja otopine analita,  $V_i$  ispitan je u području od 100 do 1000  $\mu\text{L}$  pomoću petlje injekcijskog ventila različite duljine, odnosno volumena. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastoji se od 2,0 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , 8,0 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i 40 mL acetatno-boratno-fosfatnog pufera. Kao osnovna otopina koristi se deionizirana voda.



Slika 4.5. Diagram optimizacije volumena injektiranja otopine analita kod određivanja NAC-a. Volumen injektiranja,  $V_i$ : a) 100; b) 200; c) 250; d) 500; e) 1000  $\mu\text{L}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete = 160  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura 25  $^{\circ}\text{C}$ ; pH = 3,0. Umetak: ovisnost apsorbancije (srednja vrijednost) o volumenu injektiranja otopine analita za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

#### 4.1.6. Optimizacija duljine reakcijske uzvojnice

Utjecaj duljine reakcijske uzvojnice,  $l$  ispitan je u području od 30 do 400 cm pomoću više vrsta reaktora. Otopina NAC-a,  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištena je kao analit. Reakcijska otopina sastoji se od 2,0 mL otopine  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , 8,0 mL otopine BCS-a,  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i 40 mL acetatno-borarno-fosfatnog pufera. Kao osnovna otopina koristi se deionizirana voda.



Slika 4.6. Diagram optimizacije duljine reakcijske uzvojnice kod određivanja NAC-a. Duljina reakcijske uzvojnice,  $l$ : a) 30; b) 40; c) 50; d) 60; e) 100; f) 400 cm. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0. Umetak: ovisnost apsorbanције (srednja vrijednost) o duljini reakcijske uzvojnice za spektrofotometrijsko određivanje NAC-a.

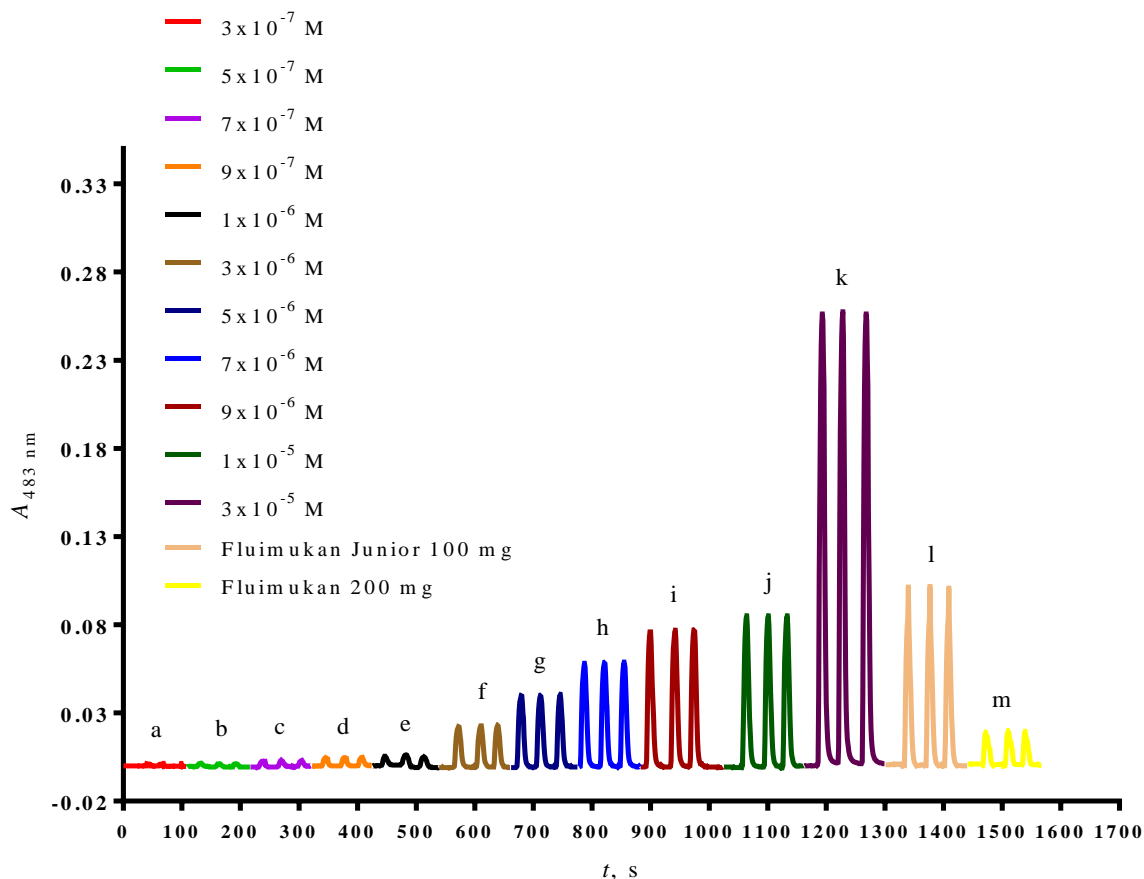
Tablica 4.2. Optimizacija parametara protočnog sustava

Parametri	Ispitivano područje	Optimalni uvjeti
Temperatura	20 °C – 50 °C [39]	25 °C [39]
pH-vrijednost	2,0 – 8,0	3,0
Molni omjer BCS i $\text{Cu}^{2+}$ , $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+})$	1 : 1 – 3 : 1	1 : 1
Volumni protok osnovne otopine, $Q_{\text{CS}}$	0,5 – 6,0 mL min <sup>-1</sup>	6,0 mL min <sup>-1</sup>
Volumni protok otopine reagensa, $Q_{\text{RS}}$	2,0 – 6,0 mL min <sup>-1</sup>	2,0 mL min <sup>-1</sup>
Volumen injektiranja otopine analita, $V_i$	100 – 1000 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
Duljina reakcijske uzvojnice, $l$	30 – 400 cm	50 cm

## 4.2. Linearno dinamičko područje

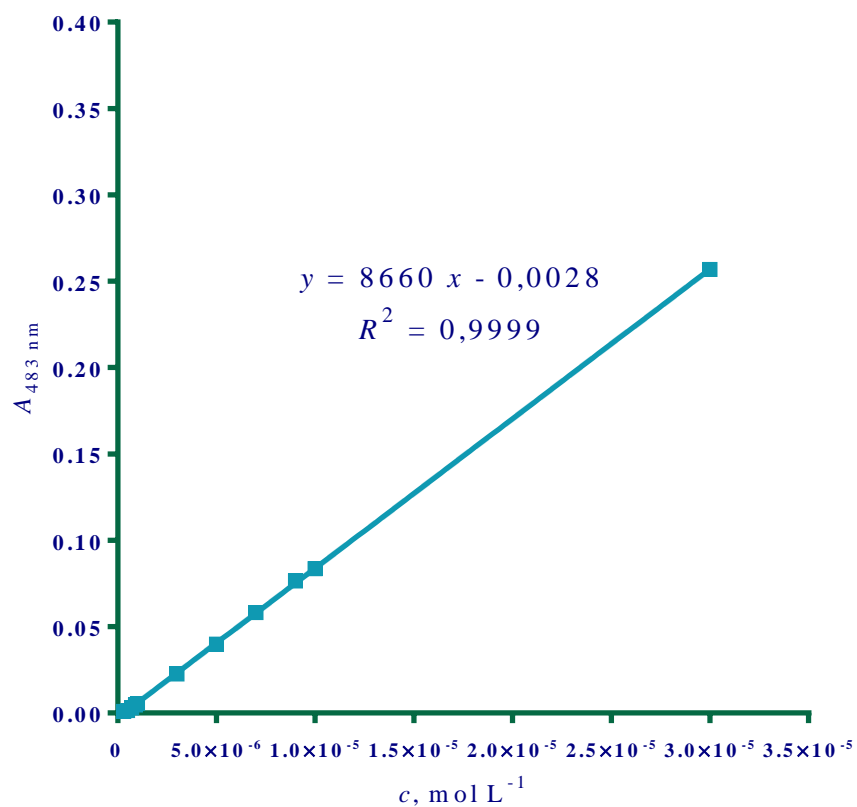
Temeljem optimiziranih uvjeta izrađena je krivulja umjeravanja. Priprema se serija standardnih otopina analita točno poznatih koncentracija ( $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) koje se injektiraju tri puta uzastopno (triplikat) za pojedinu koncentraciju i mjeri im se signal (apsorbancija). Slijedi određivanje aritmetičke sredine visine signala za svaku analiziranu koncentraciju.

LDP je onaj dio krivulje umjeravanja koji pokazuje linearnu ovisnost signala i koncentracije, a u ovom je slučaju to raspon od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije određena je jednadžba pravca  $y = 8660x - 0,0028$ , gdje je  $y$  vrijednost apsorbancije, a  $x$  koncentracija NAC-a izražena u  $\text{mol L}^{-1}$ . Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) iznosi 0,9999.



Slika 4.7. Diagram spektrofotometrijskog određivanja NAC-a. Koncentracijski raspon NAC-a u LDP-u: od a)  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do k)  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; l) Fluimukan Junior 100 mg; m) Fluimukan 200 mg. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0.





Slika 4.8. Grafički prikaz linearnog dinamičkog područja spektrofotometrijskog određivanja NAC-a. Koncentracijski raspon NAC-a: od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0.

#### 4.2.1. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) najniža je koncentracija analita u uzorku koja se može kvalitativno odrediti primijenjenom tehnikom ili metodom. Pri toj je koncentraciji signal trostruko veći od šuma. Računa se prema sljedećem izrazu:

$$D_L = \frac{3 \cdot s_b}{m}$$

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib krivulje umjeravanja [40].

Granica određivanja (engl. *Limit of quantification*, LOQ) najniža je koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti primijenjenom tehnikom ili metodom. Pri toj je koncentraciji signal deseterostruko veći od šuma. Predstavlja donju granicu LDP-a te se računa prema sljedećem izrazu:

$$Q_L = \frac{10 \cdot s_b}{m}$$

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib krivulje umjeravanja [40].

Standardna devijacija slijepe probe u ovom eksperimentu iznosi 0,00026, a nagib krivulje umjeravanja 8660. Uvrštavanjem podataka u prethodno navedene jednačbe izračunata je granica dokazivanja (LOD) koja iznosi  $9,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  te granica određivanja (LOQ) koja iznosi  $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Tablica 4.3. Analitičke karakteristike metode

<b>Varijable</b>	<b>Iznos varijable</b>
Linearno dinamičko područje, mol L <sup>-1</sup>	$3,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-5}$
Jednadžba pravca	$y = 8660 x - 0,0028$
Nagib regresijskog pravca	8660
Odsječak na osi y	- 0,0028
Koeficijent linearne regresije, $R^2$	0,9999
Granica dokazivanja (LOD), mol L <sup>-1</sup>	$9,00 \times 10^{-8}$
Granica određivanja (LOQ), mol L <sup>-1</sup>	$3,00 \times 10^{-7}$

### 4.3. Točnost (iskoristivost)

Točnost ukazuje na stupanj podudaranja mjerene vrijednosti s pravom ili očekivanom vrijednosti [41]. Iskoristivost metode (engl. *Recovery*) upućuje na njenu točnost. Ona predstavlja sposobnost metode da izmjeri poznatu količinu neke tvari.

Prilikom ispitivanja korištene su FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu. Iskoristivost je ispitana pomoću šest radnih otopina. Pripravljene su dodavanjem određenog volumena standardne otopine NAC-a u otopinu odgovarajućeg realnog uzorka, a zatim nadopunjene deioniziranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 10 mL. Priprava radnih otopina prikazana je u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Priprava radnih otopina

Oznaka otopine	V(uzorak), mL	c(uzorak), mol L <sup>-1</sup>	V(st. otop.), mL	c(st. otop.), mol L <sup>-1</sup>	V <sub>ukupno</sub> , mL	c <sub>ukupno</sub> , mol L <sup>-1</sup>
<b>A<sub>mix</sub></b>	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	–	–	10,0	$1,23 \times 10^{-6}$
<b>B<sub>mix</sub></b>	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	0,5	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$1,85 \times 10^{-6}$
<b>C<sub>mix</sub></b>	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$2,46 \times 10^{-6}$
<b>D<sub>mix</sub></b>	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	1,5	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$3,08 \times 10^{-6}$
<b>E<sub>mix</sub></b>	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	2,0	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$3,69 \times 10^{-6}$
<b>F<sub>mix</sub></b>	–	–	1,0	$1,23 \times 10^{-5}$	10,0	$1,23 \times 10^{-6}$

Za svaku od prethodno navedenih radnih otopina određena je vrijednost apsorbancije. Koristeći jednadžbu pravca  $y = 8660x - 0,0028$ , izračunata je stvarna koncentracija NAC-a u farmaceutskim pripravcima. Zatim je određena masa NAC-a koja je uspoređena s teoretskom masom.

Tablica 4.5. Ispitivanje iskoristivosti metode

Uzorak	Masa analita u uzorku, mg	Dodana masa analita, mg	Izmjereno, mg	Iskoristivost, %
FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu	100,0	–	103,06	103,06
		50	145,20	96,80
		100	196,84	98,42
		150	236,60	94,64
		200	284,46	94,82

#### 4.4. Utjecaj interferirajućih vrsta

Utjecaj stranih iona i tvari ispitan je pri koncentraciji NAC-a od  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Pripravljene su otopine interferirajućih vrsta koje mogu ometati određivanje NAC-a, a česte su kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Početne koncentracije tvari ispitane su u 500 puta većoj koncentraciji od koncentracije analita, osim acetilsalicilatne kiseline koja je pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i analit.

Granica tolerancije definirana je kao koncentracija interferirajuće vrste koja će prilikom mjerenja pokazati pogrešku manju od  $\pm 5$  %. Za one tvari koje su pokazale pogrešku veću od  $\pm 5$  %, mjerenja su ponovljena u manjim koncentracijama interferirajućih vrsta, odnosno u manjem omjeru prema analitu. No, unatoč smanjenju koncentracija, one su i dalje mnogo veće od onih koje su prisutne u komercijalnim farmaceutskim pripravcima. Relativna pogreška izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{\bar{A}_{\text{INT}} - \bar{A}_{\text{NAC}}}{\bar{A}_{\text{NAC}}} \cdot 100$$

Tablica 4.6. Utjecaj interferirajućih tvari

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija [tvar] : [NAC]	Relativna pogreška, %
Glukoza	500 : 1	+ 0,78
Fruktoza	500 : 1	+ 0,02
Kalijev nitrat	500 : 1	– 1,93
Laktoza	500 : 1	+ 0,64
Borna kiselina	500 : 1	+ 0,02
Limunska kiselina	100 : 1	– 3,22
Natrijev sulfat	500 : 1	+ 2,70
Natrijev citrat	500 : 1	+ 2,39
Vinska kiselina	100 : 1	– 3,28
Acetilsalicilatna kiselina	1 : 1	– 3,43

#### 4.5. Preciznost (ponovljivost, učestalost analize, prenošenje signala)

Preciznost opisuje slaganje između dvaju ili više rezultata mjerenja izvedenih na potpuno isti način (uzorak, analitičar, sustav za mjerenje, uvjeti rada) [41]. Preciznost razvijenih FIA metoda definirana je preko ponovljivosti metode i prenošenja signala.

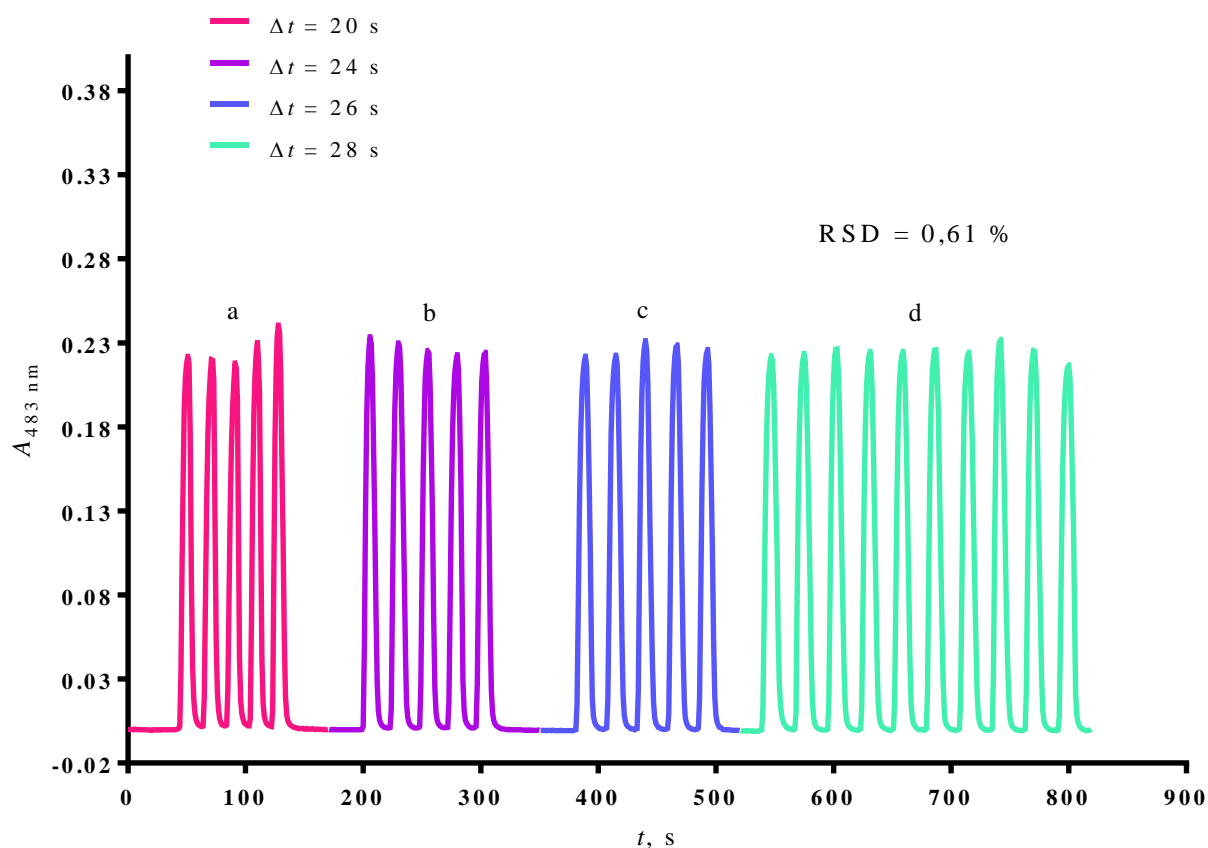
Ponovljivost opisuje podudaranje mjerenja izvedenih u istim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju. Ispitana je uzastopnim injektiranjem standardne otopine NAC-a ( $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), a izražava se relativnim standardnim odstupanjem (engl. *Relative standard deviation*, RSD) koji se dobije dijeljenjem standardnog odstupanja,  $s$  sa sredinom skupa podataka,  $\bar{x}$ . Računa se korištenjem izraza:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Temeljem zabilježenih visina signala i korištenjem prethodno navedene jednadžbe, izračunat je RSD koji iznosi 0,61 %.

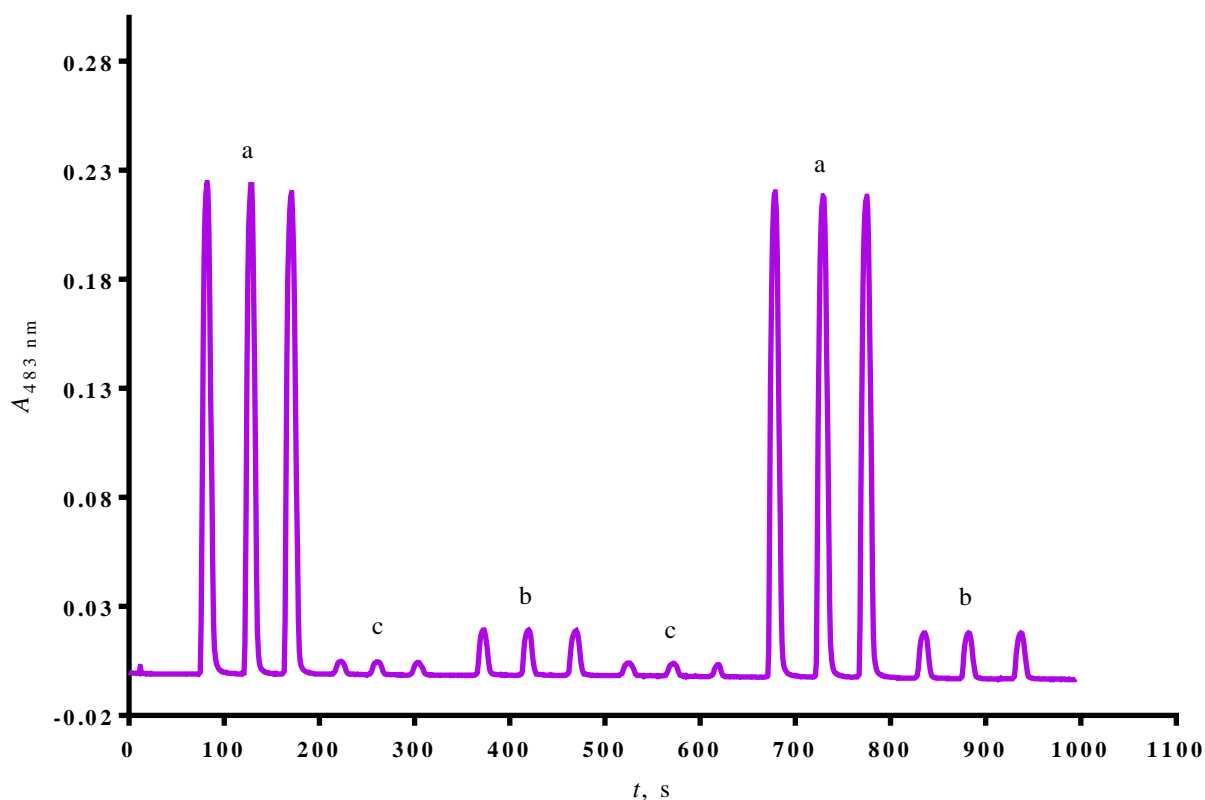
Na temelju ponovljivosti signala razvijene FIA metode, ispitana je i učestalost analiza. Ona predstavlja broj uzoraka koji se može analizirati unutar sat vremena. Ispitana je uzastopnim injektiranjem standardne otopine NAC-a ( $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u različitom vremenu, tj. svakih 20, 24, 26 i 28 sekundi prateći visinu signala i njegov povratak na osnovnu liniju.

Potrebno je prosječno 90 sekundi za analizu jednog uzorka (tri mjerenja). Stoga, moguće je oko 40 analiza u triplikatu za vrijeme jednog sata (3600 sekundi), odnosno preko 120 analiza na sat. Ovaj je parametar bitan radi postizanja analize što većeg broja uzoraka.



Slika 4.9. Fiagram ispitivanja ponovljivosti i učestalosti (vrijeme od trenutka dolaska najisturenijeg dijela zone uzorka na detektor do povratka na osnovnu liniju,  $\Delta t$ : a) 20; b) 24; c) 26; d) 28 s) optimizirane metode spektrofotometrijskog određivanja NAC-a. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0.

Prenošenje signala (engl. *Carryover*) pokazuje postoji li utjecaj prethodnog rezultata mjerenja na rezultat sljedećeg. Najčešće se promatra međusobni utjecaj različitih koncentracija analita u uzorku. Ispituje se korištenjem tri različite koncentracije NAC-a, a injektiranje je provedeno naizmjenice po tri puta za svaku od koncentracija. Pritom se prati povratak signala na osnovnu liniju te utjecaj naglih promjena na visinu signala.

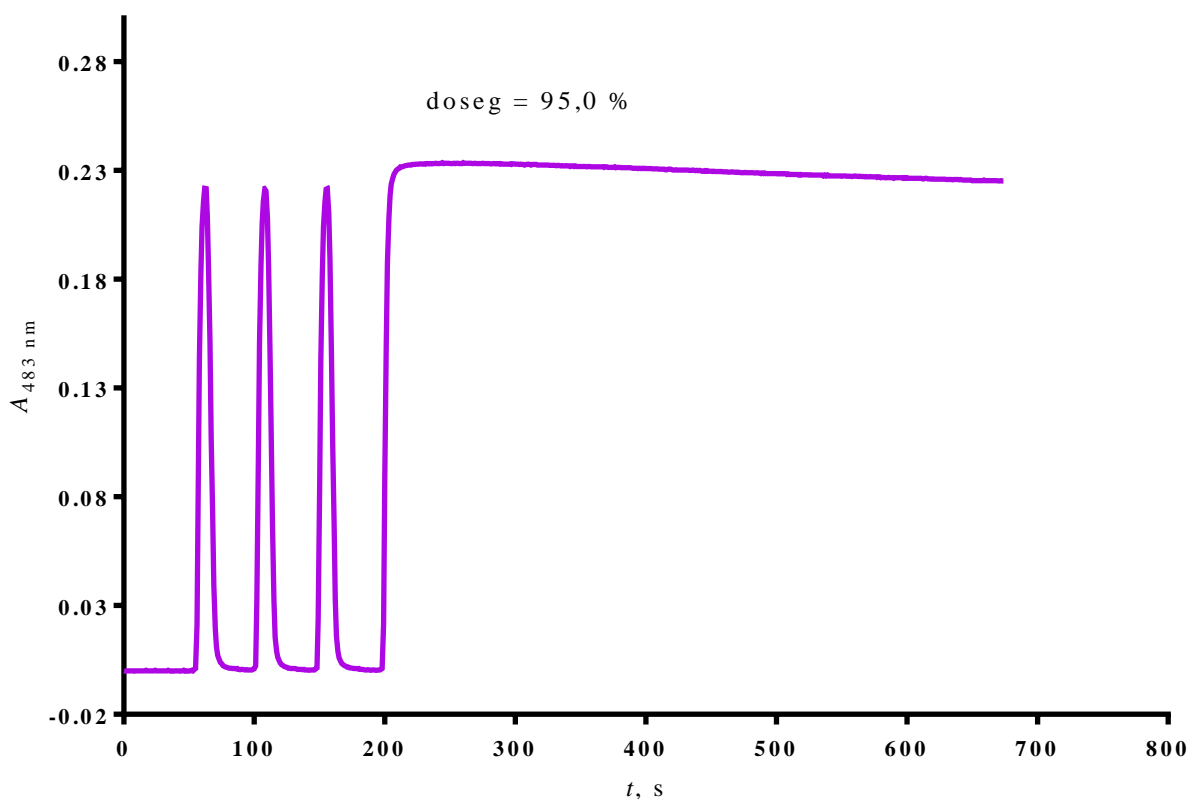


Slika 4.10. Diagram ispitivanja prenošenja signala optimizirane metode spektrofotometrijskog određivanja NAC-a: a)  $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; b)  $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; c)  $c(\text{NAC}) = 9,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0.



#### 4.6. Doseg (potpunost) reakcije

Doseg reakcije ispituje se zaustavljanjem protoka (engl. *Stop Flow*) u trenutku kada je visina vrha signala dostigla maksimum. Time se zaustavlja prijenos tvari konvekcijom što dovodi do zaustavljanja procesa disperzije zone uzorka u protočnoj kiveti. Disperzija ostaje konstantna, osim malog doprinosa difuzije između molekula [42]. Ova reakcija dostiže potpunost u iznosu od 95 %.



Slika 4.11. Fiagram ispitivanja dosega reakcije optimizirane metode spektrofotometrijskog određivanja NAC-a. Eksperimentalni uvjeti:  $c(\text{NAC}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Cu}^{2+}) = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{BCS}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $n(\text{BCS}) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 1$ ;  $Q_{\text{CS}} = 6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $Q_{\text{RS}} = 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_i = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$ ; volumen protočne kivete =  $160 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $\lambda = 483 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH = 3,0.

#### 4.7. Primjena razvijene metode na analizu realnog uzorka

Optimizirana metoda primijenjena je za određivanje *N*-acetil-L-cisteina u komercijalnim farmaceutskim pripravcima: FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu te FLUIMUKAN 200 mg, šumeće tablete (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

##### 4.7.1. Analiza realnog uzorka: FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu

Pripremljena je otopina realnog uzorka NAC-a,  $c_2(\text{NAC}) = 1,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (opisano u poglavlju 3.3.5.). Slijedi mjerenje apsorbancije ovog uzorka u triplikatu, nakon čega je potrebno izračunati srednju vrijednost (tablica 4.7.).

Tablica 4.7. Apsorbancija realnog uzorka

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A}$
1.	0,1013	0,10123
2.	0,1017	
3.	0,1007	

Prosječna vrijednost apsorbancije ( $\bar{A} = 0,10123$ ) korištena je za daljnji izračun koncentracije NAC-a u uzorku. Uvrštavanjem te vrijednosti u jednadžbu pravca  $y = 8660 x - 0,0028$ , izračunata je koncentracija  $c_2'(\text{NAC})$ .

$$y = 8660 x - 0,0028$$

$$0,10123 = 8660 \times c_2'(\text{NAC}) - 0,0028$$

$$c_2'(\text{NAC}) = 1,20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

Otopina uzorka koncentracije  $c_2(\text{NAC})$  pripremljena je u volumenu od 100 mL pomoću 1 mL otopine uzorka koncentracije  $c_1(\text{NAC})$ . Stoga, koncentracija  $c_1'(\text{NAC})$  računa se na sljedeći način:

$$c_1'(\text{NAC}) = \frac{1,20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$c_1'(\text{NAC}) = 1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Pomoću koncentracije  $c_1'$ (NAC) određuje se množina,  $n'$ . Preko množine računa se masa,  $m'$ . Izračunata masa NAC-a uspoređena je s masom na deklaraciji komercijalnog farmaceutskog pripravka.

$$n = c \times V = \frac{m}{M}$$

$$m' = c_1' \times V \times M$$

$$m' = 1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 0,5 \text{ L} \times 163,2 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m' = 0,09792 \text{ g} = 97,92 \text{ mg}$$

Pomoću razvijene FIA metode, u farmaceutskom je pripravku određeno 97,92 mg *N*-acetil-L-cisteina. Deklarirano je 100 mg.

#### 4.7.2. Analiza realnog uzorka: FLUIMUKAN 200 mg, šumeće tablete

Pripremljena je otopina realnog uzorka NAC-a,  $c_3$ (NAC) =  $2,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (opisano u poglavlju 3.3.5.). Slijedi mjerenje apsorbancije ovog uzorka u triplikatu, nakon čega je potrebno izračunati srednju vrijednost (tablica 4.8.).

Tablica 4.8. Apsorbancija realnog uzorka

Uzorak	A	$\bar{A}$
1.	0,0195	0,01953
2.	0,0199	
3.	0,0192	

Prosječna vrijednost apsorbancije ( $\bar{A} = 0,01953$ ) korištena je za daljnji izračun koncentracije NAC-a u uzorku. Uvrštavanjem te vrijednosti u jednadžbu pravca  $y = 8660 x - 0,0028$ , izračunata je koncentracija  $c_3'$ (NAC).

$$y = 8660 x - 0,0028$$

$$0,01953 = 8660 \times c_3'(\text{NAC}) - 0,0028$$

$$c_3'(\text{NAC}) = 2,58 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

Otopina uzorka koncentracije  $c_3(\text{NAC})$  pripremljena je u volumenu od 10 mL pomoću 1 mL otopine uzorka koncentracije  $c_2(\text{NAC})$ . Stoga, koncentracija  $c_2'(\text{NAC})$  računa se na sljedeći način:

$$c_2'(\text{NAC}) = \frac{2,58 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \times 10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$c_2'(\text{NAC}) = 2,58 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

Otopina uzorka koncentracije  $c_2(\text{NAC})$  pripremljena je u volumenu od 100 mL pomoću 1 mL otopine uzorka koncentracije  $c_1(\text{NAC})$ . Stoga, koncentracija  $c_1'(\text{NAC})$  računa se na sljedeći način:

$$c_1'(\text{NAC}) = \frac{2,58 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$c_1'(\text{NAC}) = 2,58 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Pomoću koncentracije  $c_1'(\text{NAC})$  određuje se množina,  $n'$ . Preko množine računa se masa,  $m'$ . Izračunata masa NAC-a uspoređena je s masom na deklaraciji komercijalnog farmaceutskog pripravka.

$$n = c \times V = \frac{m}{M}$$

$$m' = c_1' \times V \times M$$

$$m' = 2,58 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 0,5 \text{ L} \times 163,2 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m' = 0,21053 \text{ g} = 210,53 \text{ mg}$$

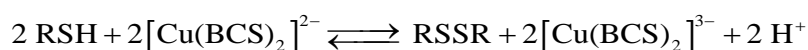
Pomoću razvijene FIA metode, u farmaceutskom je pripravku određeno 210,53 mg *N*-acetil-L-cisteina. Deklarirano je 200 mg.

Tablica 4.9. Prikaz rezultata

<b>Uzorak</b>	<b>Navedeno, mg</b>	<b>Korištena metoda, mg</b>	<b>Standardna metoda prema farmakopeji, mg</b>
FLUIMUKAN JUNIOR, granule za oralnu otopinu	100	97,92	100,30
FLUIMUKAN, šumeće tablete	200	210,53	201,90

## **5. RASPRAVA**

U ovom je radu optimizirana i vrednovana metoda određivanja *N*-acetil-L-cisteina analizom injektiranjem u protok (FIA) uz spektrofotometrijski detektor. Razvijena analitička metoda temelji se na redoks reakciji u kojoj NAC reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) u stabilni kompleks narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm.



Prilikom optimizacije sustava, ispitivani su kemijski parametri i parametri FIA sustava. To su temperatura, pH-vrijednost, molni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  te volumni protok osnovne otopine i otopine reagensa, volumen injektiranja otopine analita i duljina reakcijske uzvojnice.

Utjecaj temperature otopine uzorka na intenzitet signala ispitan je u temperaturnom rasponu od 20 °C do 50 °C. Rezultati su pokazali da je ova redoks reakcija temperaturno neovisna jer brzina reakcije i stabilnost signala ostaju nepromijenjeni u širokom rasponu temperatura. Stoga, izabrana je sobna temperatura od 25 °C iz praktičnih razloga [39].

Utjecaj pH-vrijednosti otopine uzorka promatran je u rasponu od 2,0 do 8,0 pomoću acetatno-borato-fosfatnog pufera. Kod viših pH-vrijednosti nije zabilježen značajniji porast signala, pa se za optimalnu vrijednost odabire 3,0 jer je NAC kao tiolni spoj stabilniji u kiselom mediju. To je najniža pH-vrijednost pri kojoj je postignut visoki signal (slika 4.1.).

Optimizacija molnog omjera BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  provodila se na način da je koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  održavana konstantnom, a koncentracija BCS-a je mijenjana. Pri tome se molni omjer BCS i  $\text{Cu}^{2+}$  mijenjao u rasponu od 1 : 1 do 3 : 1. Rezultati su pokazali da se signal neznatno mijenja u prethodno navedenim omjerima, pa se kao optimalan odabire 1 : 1 (slika 4.2.).

Utjecaj volumnog protoka osnovne otopine na visinu signala ispitan je u području od 0,5 do 6,0 mL min<sup>-1</sup> pomoću peristaltičke crpke. Kao optimalna vrijednost odabire se 6,0 mL min<sup>-1</sup> jer je pri njoj signal najstabilniji, a brzina povratka na osnovnu liniju je zadovoljavajuća. Iako je odabran najveći volumni protok, osjetljivost metode nije ugrožena (slika 4.3.).

Utjecaj volumnog protoka otopine reagensa na visinu signala ispitan je u području od 2,0 do 6,0 mL min<sup>-1</sup> pomoću cjevčica različitog unutarnjeg promjera. Kao optimalna vrijednost odabire se 2,0 mL min<sup>-1</sup>. Pri tom je volumnom protoku otopine reagensa postignut najviši, ali i stabilan signal (slika 4.4.).

Optimizacija volumena injektiranja otopine analita provedena je pomoću petlje injekcijskog ventila različite duljine, odnosno volumena (od 100 do 1000  $\mu\text{L}$ ). Povećanjem volumena injektiranja raste visina signala, a time i osjetljivost metode. Posljedično se povećava i širina pika u osnovici što utječe na smanjenu učestalost analiza jer je potrebno više vremena za povratak na osnovnu liniju. Zbog toga se kao optimalna duljina odabire 500  $\mu\text{L}$  kao kompromis između osjetljivosti metode i učestalosti analiza (slika 4.5.).

Utjecaj duljine reakcijske uzvojnice ispitan je u području od 30 do 400 cm pomoću više vrsta reaktora. Prekratki reaktor može dovesti do nepotpune reakcije, a preduga uzvojnica može dovesti do raspršenja zone uzorka i pada vrijednosti apsorbancije. Stoga, kao optimalna duljina odabire se 50 cm s obzirom na visinu vrha i stabilnost signala te povratak na osnovnu liniju (slika 4.6.).

Linearno dinamičko područje (LDP) ispitan je korištenjem optimiziranih parametara FIA sustava pomoću serije standardnih otopina analita u koncentracijskom rasponu od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Utvrđeno je da signal raste linearno s porastom koncentracije analita u rasponu od  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (slika 4.7.). Linearnom regresijskom analizom odnosa apsorbancije i koncentracije određena je jednadžba pravca  $y = 8660x - 0,0028$ , gdje je  $y$  vrijednost apsorbancije, a  $x$  koncentracija NAC-a izražena u  $\text{mol L}^{-1}$ . Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) iznosi 0,9999 (slika 4.8.).

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) dobivene su računski pomoću standardne devijacije slijepe probe i nagiba krivulje umjeravanja. Izračunata je granica dokazivanja koja iznosi  $9,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  te granica određivanja koja iznosi  $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , što odgovara donjoj granici linearnog dinamičkog područja.

Točnost (iskoristivost) metode ispitan je pomoću šest radnih otopina koje su pripravljene dodavanjem određenog volumena standardne otopine NAC-a u otopinu odgovarajućeg realnog uzorka (tablica 4.4.). Otopinama su izračunate apsorbancije iz kojih je pomoću jednadžbe pravca krivulje umjeravanja određena koncentracija, a zatim i masa NAC-a koja je uspoređena s teorijskom masom. Iskoristivost se kretala u rasponu od 94,64 % do 103,06 %, što upućuje na točnost metode (tablica 4.5.).

Ispitan je utjecaj interferirajućih vrsta koje se često koriste kao pomoćne tvari u komercijalnim farmaceutskim pripravcima na određivanje NAC-a. Početne koncentracije tvari ispitan su u omjeru 500 : 1 prema koncentraciji analita, osim acetilsalicilatne kiseline koja je pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i analit. Za one tvari koje su pokazale pogrešku veću



od  $\pm 5\%$ , mjerenja su ponovljena za manje koncentracije interferirajućih vrsta, odnosno u manjem omjeru prema analitu. Iz konačnih je rezultata uočljivo da glukoza, fruktoza, kalijev nitrat, laktoza, borna kiselina, natrijev sulfat i natrijev citrat ne interferiraju pri određivanju NAC-a u 500 puta većim koncentracijama, a limunska i vinska kiselina u 100 puta većim koncentracijama. Acetilsalicilatna kiselina ne interferira pri određivanju NAC-a u omjeru 1 : 1. Unatoč smanjenju koncentracija, one su i dalje mnogo veće od onih koje su prisutne u komercijalnim farmaceutskim pripravcima (tablica 4.6.).

Preciznost razvijene FIA metode definirana je preko ponovljivosti metode i prenošenja signala. Ponovljivost je ispitana uzastopnim injektiranjem standardne otopine NAC-a. Pomoću standardnog odstupanja i sredine skupa podataka određeno je relativno standardno odstupanje (RSD) koje iznosi 0,61 %. Ovaj rezultat upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode (slika 4.9.). Na temelju ponovljivosti signala, ispitana je i učestalost analiza unutar sat vremena. Potrebno je prosječno 90 sekundi za analizu jednog uzorka (tri mjerenja). Stoga, moguće je oko 40 analiza u triplicatu za vrijeme jednog sata (3600 sekundi), odnosno preko 120 analiza na sat. Ovaj rezultat upućuje na zadovoljavajuću učestalost analiza (slika 4.9.). Ispitano je i prenošenje signala pomoću tri različite koncentracije NAC-a. Injektiranje je provedeno naizmjenice po tri puta za svaku od koncentracija. Utvrđeno je da ova metoda ne dovodi do prenošenja signala, odnosno ne utječe na promjenu visine signala i omogućava povratak na osnovnu liniju (slika 4.10.).

Doseg reakcije ispituje se zaustavljanjem protoka u trenutku kada je visina vrha signala dostigla maksimum. Ova reakcija dostiže potpunost u iznosu od 95 % (slika 4.11.).

Na kraju, optimizirana i vrednovana metoda primijenjena je za određivanje *N*-acetyl-L-cisteina u farmaceutskim pripravcima: FLUIMUKAN JUNIOR 100 mg, granule za oralnu otopinu (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska) te FLUIMUKAN 200 mg, šumeće tablete (Sandoz d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Rezultati su uspoređeni s rezultatima dobivenim standardnom metodom prema farmakopeji, odnosno redoks titracijom jodom. Usporedba dviju metoda prikazana je u tablici 4.9. Prema navedenom, razvijena FIA metoda može se uspješno primijeniti za određivanje NAC-a u farmaceutskom pripravku.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog diplomskog rada bio je razvoj i vrednovanje metode određivanja *N*-acetil-L-cisteina protočnom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj tiolna skupina NAC-a reducira bis(batokuproindisulfonato)kuprat(II) u stabilni kompleks narančaste boje, bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm.

Nakon optimizacije kemijskih parametara i parametara FIA sustava, odabrane su sljedeće vrijednosti: temperatura 25 °C; pH-vrijednost 3,0; molni omjer BCS i Cu<sup>2+</sup> 1 : 1; volumni protok osnovne otopine 6,0 mL min<sup>-1</sup>; volumni protok otopine reagensa 2,0 mL min<sup>-1</sup>; volumen injektiranja otopine analita 500 µL; duljina reakcijske uzvojnice 50 cm.

Optimizirana metoda korištena je za mjerenje serije uzoraka točno poznate koncentracije kako bi se odredilo linearno dinamičko područje. Utvrđeno je da je LDP u rasponu koncentracija od  $3,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Određena je jednadžba pravca  $y = 8660x - 0,0028$  te koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) koji iznosi 0,9999. Granica dokazivanja (LOD) je pri koncentraciji od  $9,00 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, a granica određivanja (LOQ) pri  $3,00 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

Iskoristivost metode kretala se u rasponu od 94,64 % do 103,06 %, što upućuje na njenu točnost. Promatranjem utjecaja interferirajućih vrsta u koncentracijama puno većim od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima, nije dokazano ometanje signala. Relativno standardno odstupanje iznosi 0,61 %, što upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode. Kako je moguće prosječno 40 analiza u triplicatu, odnosno preko 120 analiza u sat vremena, učestalost je zadovoljavajuća. Utvrđeno je i da ova metoda ne dovodi do prenošenja signala jer ne utječe na visinu signala i povratak na osnovnu liniju. Predložena reakcija u optimiziranim uvjetima protočnog sustava dostiže potpunost u iznosu od 95 %.

Na kraju, optimizirana i vrednovana metoda korištena je za određivanje NAC-a u farmaceutskom pripravku te su rezultati uspoređeni sa standardnom metodom prema farmakopeji. Ovime je dokazana primjenjivost razvijene metode. Ona omogućava analizu velikog broja uzoraka uz potrošnju male količine reagensa, a pritom je jednostavna za upotrebu i lako dostupna većini laboratorija.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

- [1] PubChem: Acetylcysteine [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12035>.
- [2] Francetić I. i sur. Farmakoterapijski priručnik, Zagreb: Medicinska naklada; 2015. str. 751-2.
- [3] DrugBank: Acetylcysteine [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06151>.
- [4] HALMED (Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode): Sažetak opisa svojstava lijeka – Fluimukan 200 mg granule za oralnu otopinu [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Fluimukan-200-mg-granule-za-oralnu-otopinu/12289/>.
- [5] HALMED (Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode): Sažetak opisa svojstava lijeka – Naxil 200 mg šumeće tablete [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Naxil-200-mg-sumece-tablete/15345/>.
- [6] HSDB (Hazardous Substances Data Bank): *N*-Acetylcysteine [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+616-91-1>.
- [7] Tardiolo G., Bramanti P., Mazzon E. Overview on the Effects of *N*-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* [Internet]. 2018 Dec [citirano 15.9.2019.]; 23(12). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551603>.
- [8] Gupta S.K., Kamendulis L.M., Clauss M.A., Liu Z. A randomized, placebo-controlled pilot trial of *N*-acetylcysteine on oxidative stress and endothelial function in HIV-infected older adults receiving antiretroviral treatment. *AIDS* [Internet]. 2016 Sep [citirano 15.9.2019.]; 30(15):2389-91. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27603163>.
- [9] Janeczek M., Moy L., Riopelle A., Vetter O., Reserva J., Tung R. i sur. The Potential Uses of *N*-acetylcysteine in Dermatology: A Review. *J Clin Aesthet Dermatol* [Internet]. 2019 May [citirano 15.9.2019.]; 12(5):20-26. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31320973>.

- [10] Rhodes K.M., Baker D.F., Smith B.T., Braakhuis A.J. Acute Effect of Oral *N*-Acetylcysteine on Muscle Soreness and Exercise Performance in Semi-Elite Rugby Players. *J Diet Suppl* [Internet]. 2019 [citirano 15.9.2019.]; 16(4):443-453. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29958049>.
- [11] Grahovac I., Jurčić M. i sur. Priručnik za samoliječenje. Zagreb: CASI; 2017. str. 253-58.
- [12] HALMED (Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode): Baza lijekova – acetilcistein [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Trazilica/>.
- [13] Sertić M. i sur. Priručnik za samoliječenje. Zagreb: CASI; 2017. str. 93-104.
- [14] LactMed (Drugs and Lactation Database): Acetylcysteine [Internet] [citirano 15.9.2019.] Dostupno na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~p8Mzs1:1>.
- [15] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Boston MA: Cengage Learning; 2013. str. 819-46.
- [16] Radić Nj., Kukoč Modun L. *Uvod u analitičku kemiju*. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 678-710.
- [17] Flow Injection Analysis: Theory [Internet] [citirano 17.9.2019.] Dostupno na: <http://flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html>.
- [18] Christian G.D., Dasgupta P.K., Schug K.A. *Analytical Chemistry*. Hoboken NJ: Wiley; 2014. str. 789-91.
- [19] Kukoč Modun L. *Razvoj metoda spektrofotometrijskog i potenciometrijskog određivanja tiopronina u farmaceutskim preparatima [doktorska disertacija]*. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2009. str. 58-73.
- [20] Harvey D. *Analytical Chemistry 2.0 – Flow Injection Analysis (e-knjiga)* [Internet]. Chemistry LibreTexts [citirano 18.9.2019.] Dostupno na: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Book%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/13\\_Kinetic\\_Methods/13.4%3A\\_Flow\\_Injection\\_Analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/13_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis).
- [21] Biočić M. *Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva (N-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa) kao čistih tvari te u farmaceutskim pripravcima [doktorska disertacija]*. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019. str. 52-70.

- [22] Flow Injection Analysis: Methods – Flow Injection [Internet] [citirano 18.9.2019.] Dostupno na: <http://flowinjectiontutorial.com/Methods%201.0%20Flow%20Injection.html>.
- [23] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. Fundamentals of Analytical Chemistry. Boston MA: Cengage Learning; 2013. str. 744-6.
- [24] Watson D.G. Pharmaceutical Analysis. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2012. str. 84-6.
- [25] Melchert W.R., Reis B.F., Rocha F.R. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. Anal Chim Acta [Internet]. 2012 Feb [citirano 18.9.2019.]; 714:8-19. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22244133>.
- [26] Rocha F.R.P., Nobrega J.A., Fatibello Filho O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. Royal Society of Chemistry [Internet]. 2001 [citirano 18.9.2019.]; str. 216-20. Dostupno na: [https://www.academia.edu/13189889/Flow\\_analysis\\_strategies\\_to\\_greener\\_analytical\\_chemistry\\_An\\_overview](https://www.academia.edu/13189889/Flow_analysis_strategies_to_greener_analytical_chemistry_An_overview).
- [27] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. Fundamentals of Analytical Chemistry. Boston MA: Cengage Learning; 2013. str. 650-82.
- [28] Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003. str. 6-12.
- [29] Biočić M. Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tlovnih spojeva (*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa) kao čistih tvari te u farmaceutskim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019. str. 71-82.
- [30] Christian G.D., Dasgupta P.K., Schug K.A. Analytical Chemistry. Hoboken NJ: Wiley; 2014. str. 477-8.
- [31] Harvey D. Analytical Chemistry 2.0 – Spectroscopy Based on Absorption (e-knjiga) [Internet]. Chemistry LibreTexts [citirano 20.9.2019.] Dostupno na: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Book%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/13\\_Kinetic\\_Methods/13.4%3A\\_Flow\\_Injection\\_Analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/13_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis).
- [32] Christian G.D., Dasgupta P.K., Schug K.A. Analytical Chemistry. Hoboken NJ: Wiley; 2014. str. 494-503.

- [33] Štraus B., Stavljenić-Rukavina A., Plavšić F. i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb: Medicinska naklada; 1997. str. 18-27.
- [34] Harris D.C. Quantitative Chemical Analysis. New York: W. H. Freeman and Company; 2010. str. 393-418.
- [35] Radić Nj., Kukoč Modun L., Biočić M. Kinetic Spectrophotometric Determination of *N*-acetyl-L-cysteine Based on the Reduction of Copper(II)-neocuproine Reagent. Croat Chem Acta [Internet]. 2013 [citirano 15.9.2019.]; str. 65-71. Dostupno na: [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=150265](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=150265).
- [36] Radić Nj., Kukoč Modun L. Spectrophotometric determination of *N*-acetyl-L-cysteine and *N*-(2-mercaptopropionyl)-glycine in pharmaceutical preparations. Int J Anal Chem [Internet]. 2011 [citirano 15.9.2019.]; 2011:140756. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103845/>.
- [37] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 6.0. Strasbourg: Council Of Europe; 2007. str. 1100-1.
- [38] San Vicente A., Arranz A., Moreda J.M., Arranz J.F. Simplex and classical methods for the selection of parameters for the adsorptive stripping voltammetric determination of nitratin. A comparative study. Anal Chim Acta [Internet]. 1994 Nov [citirano 21.9.2019.]; str. 87-90. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003267094900450>.
- [39] Stipišić M. Kinetičko spektrofotometrijsko određivanje *N*-acetil-L-cisteina temeljeno na redukciji Cu(II)L<sub>n</sub> kompleksa. Razvoj i optimizacija metode [diplomski rad]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; 2018. str. 35-6.
- [40] Radić Nj., Kukoč Modun L. Interna skripta za nastavne potrebe: Instrumentne metode analize u farmaciji. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017. str. 14-5.
- [41] Radić Nj., Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 14-27.
- [42] Biočić M. Razvoj kinetičkih metoda i metoda analize injektiranjem u protok za određivanje farmaceutski aktivnih tiolnih spojeva (*N*-acetil-L-cisteina, cisteina, penicilamina, tiopronina i glutationa) kao čistih tvari te u farmaceutskim pripravcima [doktorska disertacija]. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019. str. 154-72.



## **8. SAŽETAK**

Razvijena je i vrednovana nova metoda određivanja *N*-acetil-L-cisteina protočnom analizom injektiranjem (FIA) uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks reakciji redukcije bis(batokuproindisulfonato)kuprata(II) uz NAC u narančasto obojeni bis(batokuproindisulfonato)kuprat(I). Apsorpcijski maksimum postiže se pri valnoj duljini od 483 nm. Optimalni kemijski parametri i parametri FIA sustava određeni su univarijantnom metodom na temelju čega je izrađena krivulja umjeravanja. Utvrđeno je da je linearno dinamičko područje (LDP) u rasponu koncentracija od  $3,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> do  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> uz jednadžbu pravca  $y = 8660 x - 0,0028$  te koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) koji iznosi 0,9999. Određena je granica dokazivanja (LOD) od  $9,00 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> te granica određivanja (LOQ) od  $3,00 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Nakon optimizacije uslijedilo je i vrednovanje metode. Iskoristivost metode kretala se u rasponu od 94,64 % do 103,06 %, što upućuje na njenu točnost. Ispitivanjem utjecaja interferirajućih vrsta u koncentracijama značajno većim od onih koje se mogu naći u farmaceutskim pripravcima, nije zamijećen poremećaj signala. Relativno standardno odstupanje iznosi 0,61 %, što upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode. S obzirom da je moguće ostvariti u prosjeku 40 analiza u triplicatu, učestalost je zadovoljavajuća. Utvrđeno je i da primjenom metode ne dolazi do prenošenja signala, a doseg (potpunost) reakcije iznosi 95 %. Predložena metoda korištena je za određivanje NAC-a u farmaceutskom pripravku te su rezultati uspoređeni sa standardnom metodom prema farmakopeji.

## **9. SUMMARY**

A new method for the determination of *N*-acetyl-L-cysteine by flow injection analysis (FIA) with a spectrophotometric detector has been developed and validated. The method is based on the redox reaction of the reduction of bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(II) with NAC into orange-colored bis(bathocuproinedisulfonate)cuprate(I). The absorption maximum is reached at a wavelength of 483 nm. Optimal chemical parameters and FIA system parameters were determined by the univariate method and as a result, the calibration curve was constructed. Linear dynamic range was achieved for the concentration range from  $3.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $3.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> with the equation  $y = 8660x - 0.0028$  and the correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.9999. The limit of detection (LOD =  $9.00 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) and the limit of quantification (LOQ =  $3.00 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) were determined. Optimization was followed by the validation of the method. The recovery of the method is ranged from 94.64 % to 103.06 % which indicates its accuracy. By observing the effect of interferences at concentrations significantly higher than those found in pharmaceutical formulations, no signal interference has been noted. The relative standard deviation (RSD) is 0.61 % which indicates adequate repeatability of the method. The frequency is also satisfying because around 40 analyzes in triplicate are possible. It was also found that this method does not allow the carryover of a signal. The completeness of the reaction is 95 %. The proposed method was used to determine NAC in pharmaceutical formulations and the results were compared with the standard pharmacopeia method.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## OSOBNİ PODATCI

- Ime i prezime: Deni Karabatić
- Datum i mjesto rođenja: 23. rujna 1995., Split, Republika Hrvatska
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Alojzija Stepinca 87, 21000 Split, Republika Hrvatska
- E-mail: [karabatic.deni@gmail.com](mailto:karabatic.deni@gmail.com)

## OBRAZOVANJE

- 2014. – 2019. *Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet* – studij: Farmacija, Sveučilište u Splitu
- 2010. – 2014. Opća gimnazija *Marko Marulić*, Split

## AKTIVNOSTI

- *Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA)*, član, 2014. – 2019.
- *11th ISABS Conference*, sudionik, 2019.
- *6. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem*, sudionik, 2019.
- Istraživanje Katedre za farmaciju, MEFST: *Pregled spontano prijavljenih sumnji na nuspojave za bezreceptne lijekove u razdoblju od 2008. do 2017. godine*, sudionik, 2019.
- *Natjecanje u izradi magistralnih pripravaka*, sudionik, 2019.
- *Kongres Udruge studenata farmacije i med. biokemije Hrvatske*, sudionik, 2018. – 2019.
- Skup Europske udruge studenata farmacije *EPSA Summer University*, sudionik, 2018.
- Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije *FARMEBS*, sudionik, 2018.
- Skup *Praktična znanja za studente*, sudionik i volonter, 2017. – 2018.
- *Natjecanje u kliničkoj suradnji studenata farmacije i medicine*, volonter, 2017.
- Tradicionalna humanitarna *Božićna fritulijada*, volonter, 2014. – 2018.

## RADNO ISKUSTVO

- *Ljekarna Splitsko-dalmatinske županije*, stručno osposobljavanje, 2019.
- *Medicinski fakultet Split*, student demonstrator, 2019.

## OSTALE VJEŠTINE

- Strani jezici: engleski jezik
- Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000
- Vozačka dozvola: B kategorija